

**Dissertação de Mestrado**

**DAYSIANE DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOQUÍMICA DO  
VENENO DA SERPENTE *Micrurus surinamensis***



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**



**DAYSIANE DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOQUÍMICA DO  
VENENO DA SERPENTE *Micrurus surinamensis***

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez  
Machado de Ávila

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Delfin  
Chávez Olórtogui

**CRICIÚMA  
2017**



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

- O48c      Oliveira, Daysiane de.  
              Caracterização bioquímica e imunológica do veneno da  
              serpente *Micrurus surinamensis* / Daysiane. – 2017.  
              70 p : il. ; 21 cm.
- Dissertação (Mestrado) Universidade do Extremo Sul  
              Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,  
              Criciúma, 2017.  
              Orientador: Ricardo Andrez Machado de Ávila.  
              Coorientador: Carlos Delfin Chávez Olórtgui.
1. Soro antielapídico. 2. Soro antiofídico. 3. Veneno de  
              serpentes. 4. Anticorpos neutralizantes. 5. Cobra-coral - Veneno.  
              I. Título.

CDD. 23. ed. 615.942





UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

**ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 284**

Com início às 13h30 (treze horas e trinta minutos) do dia vinte e nove do mês de junho de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Daysiane de Oliveira**, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, intitulada **"CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOQUÍMICA DO VENENO DA SERPENTE *Micrurus surinamensis*"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.<sup>a</sup> Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Emílio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira de Moura (Universidade Federal do Paraná – UFPR) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 14h30 (quatorze horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane Budni, Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 29 (vinte e nove) de junho de 2017 (dois mil e dezessete).

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane Budni  
Coordenadora Adjunta do PPGCS

  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária





## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação de mestrado foi elaborada seguindo a Resolução N. 08/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.



## AGRADECIMENTOS

Após todo o caminho percorrido, não poderia deixar de agradecer:

À Deus, por colocar em meu caminho pessoas que possibilitaram essa conquista.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Andrez, pela oportunidade de realizar esse sonho, pela ajuda com o planejamento dos experimentos e pela atenção com meu trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Carlos Chávez, por todas as oportunidades que me ofereceu, pela compreensão, pela confiança e por todos os ensinamentos dentro de seu laboratório.

À Rahisa, por toda a ajuda nos experimentos, pela ajuda com as burocracias, pela sua constante disposição em ajudar e pela amizade que cresceu durante esse tempo que trabalhamos juntas, sem você eu não teria conseguido fazer tudo tão bem feito.

À Dra e amiga Clara, pela amizade, apoio, disposição e também pela ajuda com os experimentos. Obrigada por estar sempre presente, por me ensinar tanto e por acreditar em mim!

À Karen por ser minha companheira desde o início, compartilhando alegrias, resultados e decepções. Muito obrigada!

Às melhores amigas de laboratório e da vida Stephanie, Fernanda, Gabi e Letícia por me inspirarem cada dia mais. Obrigada pelos conselhos, orientações, ajudas e todas as risadas. Sem vocês não teria chegado onde estou!

À Dra. Gabriela Trevisan e suas brilhantes alunas Paula, Gabi e Ale, por todo suporte e ensinamento com o experimento de edema e dor.

À Dra. Vanessa e seus alunos sempre dispostos pela amizade, ajuda com os experimentos e companheirismo.

Ao melhor grupo de mestrado que eu poderia ter arrumado, Suelen, Allan e Henrique, por todos os trabalhos feitos, pela grande amizade formada e por serem meus companheiros nessa jornada. Muito obrigada. Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas por estarem presentes na minha caminhada acadêmica na UFMG e por colaborarem de alguma forma neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular pelo companheirismo durante esse último ano, pelas risadas, longas conversas e torcida. Obrigada por me ajudarem a terminar meus experimentos.

Às amigas de trabalho, Lu, Ju e Jadna por sempre entenderem minhas ausências no trabalho e por todo o incentivo.



À Adri e Paula pela amizade, companheirismo, carinho e pelos puxões de orelha.

À Gabi e Marina por sempre acreditarem em mim e por serem meu porto seguro nas horas mais difíceis. Nada disso estaria acontecendo se não fosse o apoio de vocês!

A todos meus outros amigos, por fazerem da minha vida mais prazerosa.

À minha mãe, por ser meu exemplo de vida, por todo amor e confiança.

Obrigada por nunca me abandonar e sempre me segurar em seus braços.

Sem sua motivação, não teria chegado onde estou.

Ao meu pai, por ter me dado a vida e por sempre velar por mim, independente de onde esteja.

Ao meu irmão, meu grande amigo, que sempre torceu por mim e sempre me apoiou em todas as decisões da vida.

Ao Ricardo por seu meu companheiro de vida, por todo apoio, ajuda, atenção, pela extrema paciência em aguentar meu estresse e por cuidar de mim nos momentos que eu mais preciso. A sua importância em todos os aspectos deste trabalho é indescritível.

Aos meus avós, tios e primos por serem a família mais maravilhosa que alguém pode ter. Obrigada por acreditarem em mim todos os dias!

A todos os meus professores e mestres, que possibilitaram essa vitória.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!



## RESUMO

Acidentes com serpentes são considerados um problema de saúde pública, estando inclusos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde. Apesar da baixa incidência dos acidentes com as serpentes do gênero *Micrurus*, a potencial gravidade dos mesmos e a escassez de informações bioquímicas dos venenos destas cobras-corais, faz com que aumente a necessidade de investigação. Alguns venenos do gênero *Micrurus* já possuem seus mecanismos fisiopatológicos e sua composição melhor descritos. Entretanto, para o veneno de *Micrurus surinamensis*, há poucas informações a respeito da fisiopatologia e seus componentes principais, limitando, desta forma, o melhor entendimento molecular do mecanismo provocado pelo veneno. O soro comercial utilizado para o tratamento dos envenenamentos é produzido pela hiperimunização de cavalos com venenos do gênero *Micrurus*, porém o veneno de *M. surinamensis* não é incluso nesta produção, o que pode gerar um tratamento ineficaz em indivíduos picados por esta serpente. Neste sentido, este trabalho procurou investigar as moléculas presentes do veneno e suas atividades. Para avaliar o perfil proteico dos venenos foi realizada eletroforese SDS-PAGE. O veneno de *M. surinamensis* possui todas as suas proteínas abaixo de 31kDa, enquanto *M. frontalis* tem bandas até 50kDa. Já em relação a toxicidade, *M. frontalis* apresentou uma DL50 de 0,69 mg/kg em camundongos e uma EC50 em células MGSO-3 de 4,219 µg, enquanto que *M. surinamensis* possui uma DL50 de 0,75 mg/kg e uma EC50 de 25,47 µg. A verificação da presença de atividades enzimáticas foi avaliada através de ensaios *in vitro*. Ambos venenos apresentaram atividade hialuronidásica, entretanto apenas o veneno de *M. frontalis* apresentou as atividades fosfolipásica e de L-aminoácido oxidase. Para avaliação da capacidade de produzir edema e dor, camundongos tiveram os venenos injetados na pata. Os venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* apresentaram edema consideráveis. Apenas o veneno de *M. frontalis* foi capaz de gerar dor nos camundongos. Também foi produzido um soro antiveneno de *M. surinamensis* em coelhos para se realizar uma comparação com os soros comerciais produzidos no Brasil e Costa Rica. Através de ELISA e Western Blot e do ensaio de neutralização em camundongos, foi percebido que o soro produzido em coelhos foi capaz de reconhecer fortemente o veneno de *M. surinamensis* em ambos os ensaios e também de neutralizar a ação tóxica do veneno em animais. Já os soros comerciais foram capazes de reconhecer e neutralizar apenas parcialmente o veneno de *M.*





*surinamensis*. O veneno de *M. frontalis* apresentou comportamento contrário ao de *M. surinamensis*, não sendo reconhecido pelo soro produzido em coelhos e apresentando reatividade com os soros comerciais. Como conclusão temos que o veneno de *M. surinamensis* apresenta um perfil proteico e de atividades biológicas muito diferente do veneno de *M. frontalis*, o que faz com que o veneno não seja totalmente reconhecido e neutralizado pelos soros comerciais antielapídico produzidos no Brasil e na Costa Rica. Este fato se torna um problema de saúde pública, uma vez que indivíduos picados pela serpente da espécie *M. surinamensis* podem não receber um soro antielapídico eficiente para tratar os efeitos tóxicos do veneno, podendo levar a morte.

Palavras-chave: veneno, *Micrurus surinamensis*, *Micrurus frontalis*, antiveneno, atividades biológicas.



## ABSTRACT

Although there is low incidence of envenomation by *Micrurus sp.*, the gravity of the envenomation and the lack of biochemistry information about the venoms of coral snakes increase the need to investigate these venoms. Some venoms from the *Micrurus sp* have their physiopathological mechanisms and their composition better described. However, as for the *Micrurus surinamensis*, there is little information about its physiopathological mechanisms and its main components, which limits both the best molecular understanding of the physiopathological mechanism induced by this venom and also the appropriate treatment. This work tried to investigate the components and the activities of the venom from *M. surinamensis*. In order to evaluate the protein profile of the venoms, electrophoresis SDS-PAGE was performed. The venom from *M. surinamensis* has all its proteins below 31 kDa, whereas the venom from *M. frontalis* has its proteins up to 50 kDa. With regard to the toxicity, *M. frontalis* venom showed LD50 of 0,69 mg/kg in mice and EC50 of 4,219 µg in MGSO-3 cells, whereas *M. surinamensis* presented LD50 of 0,75 mg/kg and EC50 of 25,47 µg. The presence of enzymatic activities was evaluated by *in vitro* assays. Both venoms presented hyaluronidase activities, but only the venom from *M. frontalis* presented phospholipase activities and LAEO. In order to evaluate the capacity of edema production and nociception in laboratory rats, the venoms was injected subcutaneously under the surface of their right hind paw. The venoms from *M. surinamensis* and *M. frontalis* presented relevant edematogenic responses. Only the venom from *M. frontalis* was able to produce nociceptive responses. Besides, an *M. surinamensis* antivenom serum was produced in rabbits in order to be compared with the commercial serum produced in Brazil and in Costa Rica. Through ELISA, Western Blot and neutralization assays in mice, we could perceive that the antivenom serum produced in rabbits was able both to recognize the venom from *M. surinamensis* in both assays and also to neutralize the toxic action of the venom in other animals. However, the commercial sera were able to only partially recognize and neutralize the venom of the *M. surinamensis*. The venom of *M. frontalis* presented contrary behavior to that of *M. surinamensis*. In conclusion, the venom of the *M. surinamensis* presents a protein profile and biological activities that are very different from the venom of *M. frontalis*, which makes the venom not fully recognized and neutralized by commercial antielapid serum produced in Brazil and in Costa Rica. This fact became a problem of public health, because the individuals



bitten by coral snake *M. surinamensis* may not receive an effective antielapid serum to treat the toxic effects of the venom, which may lead to death.

Key-words: venom, *Micrurus surinamensis*; *Micrurus frontalis*; antivenom; biological activity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Notificação de acidentes por serpente no ano de 2014. ....	10
Figura 2: Classificação final dos casos de envenenamento por serpentes no ano de 2014. ....	11
Figura 3: Distribuição das principais serpentes do gênero <i>Micrurus</i> no Brasil. ....	12
Figura 4: Manifestações clínicas do envenenamento por <i>Micrurus</i> . ....	16
Figura 5: Soro antielapídico produzido pelo Instituto Butantan. ....	17
Figura 6: Serpente <i>Micrurus frontalis</i> . ....	19
Figura 7: Serpente <i>Micrurus surinamensis</i> . ....	20
Figura 8: Desenho experimental do experimento de avaliação de dor e edema. ....	29
Figura 9: Perfil eletroforético dos venenos de <i>M. frontalis</i> (M.fron) e <i>M. surinamensis</i> (M.suri). ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 10: Viabilidade celular das células MGSO-3. ....	31
Figura 11: Atividade hialuronidásica. ....	32
Figura 12: Atividade fosfolipásica. ....	33
Figura 13: Atividade de LAAO. ....	34
Figura 14: Edema de pata. ....	35
Figura 15: Tempo de lambida da pata. ....	36
Figura 16: ELISA dos soros antiveneno de <i>M. surinamensis</i> e antiveneno de <i>M. frontalis</i> . ....	38
Figura 17: ELISA dos soros comerciais do Brasil e Costa Rica. ....	39
Figura 18: Western Blot dos venenos de <i>M. surinamsnsis</i> e <i>M. frontalis</i> com soro produzido em coelhos. ....	41
Figura 19: Western Blot dos venenos de <i>M. surinamsnsis</i> e <i>M. frontalis</i> com soros comerciais. ....	42
Figura 20: Western Blot dos venenos de <i>M. surinamsnsis</i> e <i>M. frontalis</i> com soro pré-imune. ....	43





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 ACIDENTES COM ANIMAIS PEÇONHENTOS .....	9
1.2 SERPENTES .....	9
1.3 O GÊNERO <i>MICRURUS</i> .....	11
1.4 A COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DAS SERPENTES DO GÊNERO <i>MICRURUS</i> .....	12
1.5 O ENVENENAMENTO POR <i>MICRURUS</i> .....	15
1.6 TRATAMENTO.....	16
1.7 A ESPÉCIE <i>Micrurus frontalis</i> .....	19
1.8 A ESPÉCIE <i>Micrurus surinamensis</i> .....	20
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 ANIMAIS, VENENOS E SOROS.....	23
3.2 ELETROFORESE SDS-PAGE .....	23
3.3 DOSE LETAL MÉDIA (DL <sub>50</sub> ).....	24
3.4 CITOTOXICIDADE .....	24
3.5 ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA.....	25
3.6 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA .....	25
3.7 ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO) .....	26
3.8 PRODUÇÃO DO SORO ANTIVENENO DE <i>M. surinamensis</i> ....	26
3.9 <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA) .....	26
3.10 WESTERN BLOT.....	27
3.11 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE EDEMA E NOCICEPÇÃO .....	28
3.12 NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE LETAL.....	29
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 PERFIL ELETROFORÉTICO.....	30
4.2. DOSE LETAL MÉDIA (DL <sub>50</sub> ).....	30
4.3. CITOTOXICIDADE.....	31
4.4. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA .....	32
4.5. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA.....	32
4.6. ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO).....	33
4.7. ATIVIDADES DE EDEMA E NOCICEPÇÃO .....	34
4.8. PRODUÇÃO DE SORO ANTI- <i>M. surinamensis</i> .....	36
4.9. <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA).....	37
4.10. WESTERN BLOT.....	40
4.11. NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE LETAL.....	43



<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO (S) .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A – Certificado CEUA .....</b>	<b>69</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ACIDENTES COM ANIMAIS PEÇONHENTOS

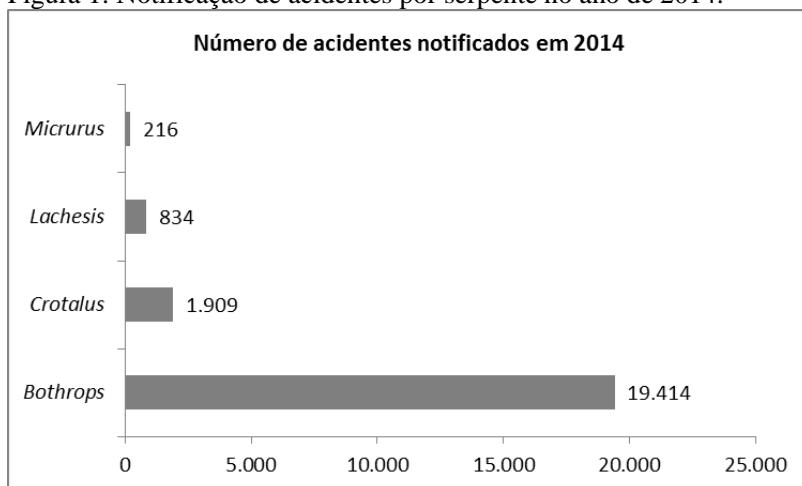
Dentre os diversos agravos na saúde pública mundial, os acidentes causados por animais peçonhentos vêm ganhando destaque desde que a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2007, os classificou dentre os problemas de saúde negligenciados. Desta forma, a prevenção, diagnóstico e o tratamento para estes envenenamentos tornam-se um grande desafio para a saúde pública mundial, uma vez que não são realizados investimentos necessários para a solução dessas dificuldades (WHO, 2007). No Brasil, somente no ano de 2014, através do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foram notificados mais de 170 mil casos de acidentes com animais peçonhentos. Dentre eles, os escorpiões são os maiores causadores de envenenamentos, seguidos das serpentes e aranhas (Ministério da Saúde, 2016).

## 1.2 SERPENTES

Em todo o mundo existem cerca de 3.600 espécies de serpentes conhecidas, dentre elas, aproximadamente 450 são peçonhentas (UETZ, 2016). Essas serpentes podem ser agrupadas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Colubridae e Atractaspidae. Já no Brasil, são encontradas 375 espécies no total, sendo que 55 têm características peçonhentas (Bérnills e Costa, 2011). Os principais gêneros responsáveis pelos acidentes em nosso país são *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (Ministério da Saúde, 2016).

Em relação ao número de acidentes no país provocados por essas serpentes no ano de 2014, nota-se através da figura 1 uma maior quantidade de notificações de envenenamentos botrópicos (19.414 notificações), seguidos pelos acidentes crotálicos (1.909 notificações), laquéticos (834 notificações) e micrúricos (216 notificações). O número de casos registrados está relacionado com a sazonalidade, bem como os períodos de atividade humana no campo, o que determina um período de incidência nos meses quentes e chuvosos, em indivíduos adultos, do sexo masculino durante o trabalho na zona rural (Ministério da Saúde, 2016).

Figura 1: Notificação de acidentes por serpente no ano de 2014.

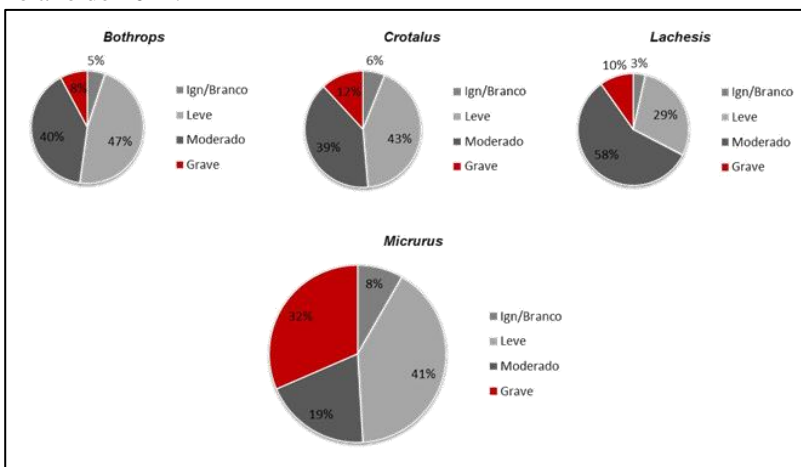


Fonte: Ministério da Saúde, 2016.

Entretanto, quando se leva em consideração a gravidade dos acidentes provocados por essas serpentes o panorama se altera. Pode-se observar que os envenenamentos causados pelo gênero *Micrurus* são capazes de causar quadros mais severos nos acidentados, onde num total de 216 casos, 32% dos pacientes apresentaram um quadro grave do envenenamento. Em contrapartida, os acidentes envolvendo as outras serpentes causam entre 8% e 12% de gravidade. Estes percentuais de classificação podem ser observados na Figura 2 (Ministério da Saúde, 2016).

Diante desses fatos, o estudo sobre a composição e fisiopatologia do veneno das serpentes do gênero *Micrurus* se torna extremamente importante, uma vez que os acidentes por esse tipo de serpente são considerados potencialmente graves (Pinho e Pereira, 2001).

Figura 2: Classificação final dos casos de envenenamento por serpentes no ano de 2014.



Em vermelho, casos de envenenamento considerados graves.

Fonte: Ministério da Saúde, 2016.

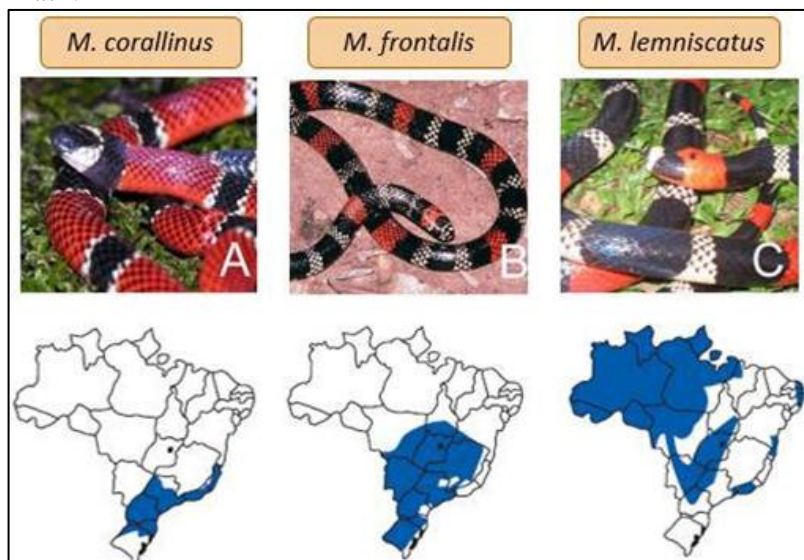
### 1.3 O GÊNERO *MICRURUS*

As serpentes pertencentes ao gênero *Micrurus* fazem parte da Família Elapidae e são consideradas de pequeno porte, medindo de 60 a 160 centímetros de comprimento. Comumente conhecidas como cobras-corais, possuem uma coloração aposemática marcante, apresentando anéis completos em torno do corpo (Moreira et al., 2010). Possuem cabeça arredondada, olhos pequenos e ausência de fosseta loreal. São ovíparas e, em sua maioria, possuem hábitos semi-subterrâneos, se alimentando de pequenas serpentes e répteis serpentiformes. O gênero possui uma grande importância médica, uma vez que seus acidentes são caracterizados por serem potencialmente tóxicos devido à grande neurotoxicidade do veneno (Cecchini et al., 2005; Ministério da Saúde, 2001).

No Brasil, as 18 espécies de *Micrurus* estão distribuídas por praticamente todo o território, principalmente nos ambientes florestais. As principais representantes do gênero são as *Micrurus corallinus* (Figura 3A), encontrada na região sul e litoral sudeste, as *Micrurus frontalis* (Figura 3B), encontrada nas regiões sul, sudeste e parte da

região centro-oeste e as *Micrurus lemniscatus* (Figura 3C), presente nas regiões norte e centro-oeste. São serpentes não agressivas e só atacam quando se sentem ameaçadas, o que também pode explicar uma menor incidência de acidentes (Pinho e Pereira, 2001; Ministério da Saúde, 2001).

Figura 3: Distribuição das principais serpentes do gênero *Micrurus* no Brasil.



Em azul, regiões onde as espécies são encontradas.

Fonte: Ministério da Saúde, 2001.

#### 1.4 A COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DAS SERPENTES DO GÊNERO *MICRURUS*

Os venenos das serpentes são complexas misturas de proteínas e peptídeos que podem atuar de diferentes formas no organismo das presas. Essas moléculas são capazes de se ligar com receptores e canais iônicos ou podem possuir uma forte atividade enzimática, agindo nos mais diversos substratos. Também estão presentes nos venenos, carboidratos, lipídeos, metais e nucleotídeos cujas funções de algumas dessas ainda não estão totalmente esclarecidas. Através da interação das toxinas do veneno com as proteínas do organismo da presa podem



ocorrer diversas desregulações nos mais variados sistemas, como o nervoso, hemostático, renal e cardiovascular (Vonk et al., 2011).

A composição dos venenos é variada e os mecanismos que controlam suas variações e produção não são completamente compreendidos. As serpentes adaptam sua peçonha de modo a facilitar a captura da presa, o que provoca diferentes efeitos em cada organismo e depende, também, da quantidade de veneno inoculada. Entretanto, entre animais da mesma espécie, a composição é muito semelhante, bem como as famílias de proteínas encontradas em venenos de serpentes que possuem relações filogenéticas (Machessy, 2010).

Estudos experimentais têm demonstrado que os venenos de *Micrurus* podem ser cardiotoxícos, miotóxicos, hemolíticos, hemorrágicos e edematogênicos. Além disso, algumas atividades enzimáticas foram identificadas, incluindo aquelas que são derivadas das ações de fosfolipases A2, hialuronidases, fosfodiesterases, leucina amino peptidases, L-aminoácido desidrogenases, acetilcolinesterases e L-aminoácido oxidases. Ações anticoagulantes também foram identificadas em algumas espécies, ao contrário da atividade proteolítica, que foi pouco ou não detectada (Tanaka et al., 2010).

Apesar da presença de diversas proteínas com diferentes ações, os venenos de *Micrurus* são conhecidos pelo seu potencial neurotóxico. A ação neurotóxica do veneno das cobras-corais brasileiras começou a ser descrito por Vital Brazil (Brazil, 1965, 1980, 1987), onde foi demonstrada a ação pré e pós-sináptica dos venenos de *Micrurus corallinus*, *Micrurus frontalis* e *Micrurus lemniscatus*. Desde então, diversos pesquisadores de empenham em elucidar melhor esses mecanismos (Gutierrez et al., 2016).

As neurotoxinas presentes nos venenos de *Micrurus* bloqueiam a transmissão neuromuscular por diferentes mecanismos de ação, podendo se ligar a receptores pré e pós-sinápticos, inibir a liberação de acetilcolina e a ação da acetilcolinesterase, entre outras formas. Elas são os principais componentes do veneno, estando representadas, principalmente, pelas fosfolipases A2 (PLA2) e pelas proteínas de três dígitos (3FTX) (Moreira et al, 2010). As PLA<sub>2</sub> também podem ser responsáveis pelas manifestações miotóxicas, edematogênicas e hemostáticas provocadas pelo veneno de *Micrurus* (Castro et al., 2015)

Além das neurotoxinas, as Lectinas tipo-C também são proteínas não enzimáticas presentes em diversos venenos ofídicos. Têm a capacidade de agir em processos biológicos da hemostase sanguínea, atuando tanto como agonistas como antagonista da agregação plaquetária, através da

interação com receptores de plaquetas. Essas proteínas também são conhecidas pela possibilidade de ligação com carboidratos, favorecendo processos biológicos de aglutinação, adesão, endocitose e neutralização de patógenos (Leão et al., 2009; Jiang et al., 2011).

Uma classe proteica presente nestes venenos são as metaloproteases. As metaloproteases de venenos ofídicos englobam uma complexa subfamília de enzimas dependentes de zinco que exercem uma variedade de atividades biológicas como: hemorrágica, inibição da agregação plaquetária, coagulopática, mionecrose e respostas inflamatórias (De Oliveira Junior et al., 2013). Entretanto, diferente das outras famílias ofídicas, as metaloproteases, não estão presentes em grandes quantidades e variedades nos venenos elapídicos, mas, quando presentes, exercem um efeito biológico importante no envenenamento (Leão et al., 2009).

Também presente nos venenos de *Micrurus*, as serinoproteases são capazes de atuar em elementos da cascata da coagulação de forma específica ou não. A maneira de atuação inespecífica é através da degradação proteolítica de proteínas que estão envolvidas na hemóstase. Já a forma específica seria na ativação ou inativação de alguns fatores de coagulação envolvidos na agregação plaquetária. Podem atuar ainda em diversas atividades biológicas, como diferenciação celular, homeostase e digestão da presa (Leão et al., 2009).

Outra classe de proteína importante para a patologia do veneno é da hialuronidase, que também já foi descrita como componente do veneno de diversos outros animais, como vespas, serpentes, escorpiões, peixes e aranhas. Essa classe de enzima é considerada responsável pela disseminação gravitacional na pele e/ou difusão sistêmica do veneno, uma vez que tem a capacidade de degradar o ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos, substâncias que medeiam a manutenção da integridade e estabilidade dos tecidos. Com a degradação desses glicosaminoglicanos, a hialuronidase reduz a viscosidade do ácido hialurônico e torna a matriz extracelular menos rígida. Essa modificação torna a matriz mais permeável a outras toxinas do veneno, facilitando a propagação dos outros constituintes e das células inflamatórias (Barbaro et al., 2005; Ferrer et al., 2013)

Também podem estar presentes nos venenos das cobras-corais, porém em menores quantidades, peptídeos natriuréticos, inibidores de Kunitz, L-aminoácido oxidases, fator neurotrófico e waprinas (Leão et al., 2009).

## 1.5 O ENVENENAMENTO POR *MICRURUS*

O envenenamento pelas serpentes do gênero *Micrurus* é caracterizado por apresentar diversas manifestações locais e sistêmicas. Como já apresentado anteriormente, o indivíduo que sofrer um acidente por esse tipo de serpente pode apresentar sintomas relacionados com a toxicidade cardíaca, neural, muscular, renal e vascular. Entretanto é mais comum que os sintomas apresentados sejam derivados dos efeitos neurotóxicos e miotóxicos (Gutiérrez et al., 2016). As neurotoxinas presentes nos venenos elapídicos possuem baixa massa molecular, fazendo com que sejam rapidamente absorvidas pela circulação e difundida para os tecidos, o que explica a rapidez no aparecimento dos sintomas neurológicos do envenenamento (Brazil, 1987; 1990; Leão et al., 2009).

O diagnóstico do envenenamento por cobras-corais é problemático, pois o local da picada pode ser de difícil visualização e nem sempre ocorre a sudorese, característica das picadas por serpentes. Os sintomas que podem ocorrer nos indivíduos incluem náuseas, vômitos, dores de cabeça, dores abdominais, diaforese, parestesia, disfonia, disfagia e insuficiência respiratória. O aparecimento dos sintomas pode ocorrer em até doze horas após a picada. Após o diagnóstico de acidente micrúrico, o paciente deve ter seu estado respiratório monitorado com cautela, dispondo sempre de suporte respiratório quando se iniciarem os sintomas, a fim de evitar o agravamento do caso (Quan, 2012).

O envenenamento sistêmico é caracterizado, principalmente, pela atividade neurotóxica pré e pós-sináptica de algumas toxinas na junção neuromuscular. Essa atividade culmina com o bloqueio da liberação da acetilcolina na fenda e a competição das neurotoxinas pelos receptores colinérgicos na placa terminal, o que provoca uma síndrome miastênica aguda. Nesta situação clínica é possível observar ptose palpebral, dificuldade de acomodação visual, oftalmoplegia, sialorreia e dispneia restritiva e obstrutiva (Figura 4) (Silva Junior e Bucretchi, 2009).

Figura 4: Manifestações clínicas do envenenamento por *Micrurus*.



(A) Face miastênica. (B) Ptose palpebral.

Fonte: Ministério da Saúde, 2001.

As manifestações locais são discretas, onde a marca das presas no local da picada aparece de forma variável. Entretanto, o não aparecimento destes sinais não está relacionado com o aparecimento ou não dos sintomas sistêmicos. O edema pode estar presente, porém de forma discreta (Silva Junior e Bucretchi, 2009).

A decisão de tratar o paciente com antiveneno deve ser tomada levando em consideração quais espécies de corais são encontradas na região geográfica onde ocorreu o envenenamento, para analisar qual espécie pode ter causado o acidente. O antiveneno pode não ser eficiente se os sinais neurológicos já se iniciaram (Quan, 2012).

## 1.6 TRATAMENTO

O soro ou antiveneno é caracterizado por ser um imunobiológico utilizado no tratamento de intoxicações causadas pelo veneno de animais peçonhentos ou por outras toxinas. Possuem anticorpos capazes de neutralizar o efeito tóxico dos venenos. No Brasil, há mais de 100 anos, são produzidos através da metodologia de hiperimunização de cavalos (Silva, 2013). Atualmente, este procedimento é realizado no país por quatro instituições nacionais, o Instituto Butantan, em São Paulo; a Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte; o Instituto Vital Brazil, no

Rio de Janeiro; e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, em Curitiba. Essas instituições são responsáveis por repassar todos os antivenenos ao Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2001).

Os antivenenos são considerados a forma mais eficaz de neutralização da peçonha, sendo o tratamento recomendado pela OMS. A soroterapia com antiveneno (SAV), quando indicada, é uma etapa fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados pela maioria dos animais peçonhentos. Tanto para crianças quanto para adultos, a dose indicada é a mesma, pois independente do peso do paciente, o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de veneno circulante. O antiveneno deve ser administrado preferencialmente por via intravenosa, diluído ou não em solução fisiológica (Ministério da Saúde, 2001).

No caso de acidentes por serpentes do gênero *Micrurus* o soro antielapídico deve ser utilizado. No Brasil, este soro é produzido pelo Instituto Butantan e pela Fundação Ezequiel Dias de forma muito semelhante. O soro antielapídico é bivalente, sendo produzido pela hiperimunização em cavalos com os venenos das serpentes *M. frontalis* e *M. corallinus* (proporção de 1:1) recebidas de diferentes regiões do Brasil. O soro é constituído de imunoglobulinas heterólogas (IgG) purificadas e digeridas por digestão enzimática (pepsina). Essa digestão ocorre para que as IgG's percam a porção Fc de sua composição, pois essas são responsáveis pela ativação do sistema do complemento pela via clássica, o que poderia ocasionar maiores reações adversas na utilização do soro. Obtêm-se, então, uma molécula mais pura e menos reatogênica quanto a efeitos de natureza alérgica (Instituto Butantan, 2016).

Figura 5: Soro antielapídico produzido pelo Instituto Butantan.



Fonte: Instituto Butantan.

Como preconizado pelas agências regulatórias, o poder neutralizante do soro antielapídico deve ser no mínimo de 1,5 mg do veneno de referência (*M. frontalis*) por mL do soro. Como todos os acidentes elapídicos devem ser considerados potencialmente graves, a recomendação do Ministério da Saúde é que todos os pacientes que apresentarem qualquer sintoma do envenenamento devem ser tratados com o soro antielapídico, conforme a Tabela 1 (Instituto Butantan, 2016; Ministério da Saúde 2001).

Tabela 1: Tratamento recomendado em caso de acidentes elapídicos.

<b>Manifestações e tratamento</b>	<b>Classificação</b>
Ptose palpebral Distúrbios de acomodação visual Oftalmoplegia Diplopia Sialorreia Disfagia Insuficiência Respiratória Aguda	Grave
Soroterapia (quantidade de ampolas)	10
Via de administração	Intravenosa

Fonte: Instituto Butantan

Reações à soroterapia podem estar presentes em pacientes que fazem o tratamento, podendo ser classificadas como precoces ou tardias. A maioria das manifestações precoces ocorre durante a administração do antiveneno, caracterizadas por aparecimento de urticária, tremores, tosse, náuseas, dor abdominal, prurido e rubor facial. Podem ocorrer em até 87% dos casos. Já as reações tardias, também conhecidas como Doença do Soro, podem ocorrer em até 24 dias após o envenenamento, onde o paciente pode apresentar febre, artralgia, linfadenomegalia, urticária e proteinúria (Ministério da Saúde, 2001).

### 1.7 A ESPÉCIE *Micrurus frontalis*

As serpentes pertencentes à espécie *Micrurus frontalis* são encontradas, no Brasil, principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo a coral verdadeira de maior distribuição e mais abundante no cerrado brasileiro (Souza et al., 2006). Se alimentam basicamente de outras serpentes, mas também podem estar incluídos em sua dieta algumas espécies de anfíbios. Possuem como principal característica morfológica a presença do focinho preto com a borda das escamas brancas (Figura 6) (Jorge da Silva e Aird, 2006).

Figura 6: Serpente *Micrurus frontalis*.



A presença do focinho preto com a borda das escamas brancas é característica diferencial da espécie.

Fonte: [www.faunaparaguay.com](http://www.faunaparaguay.com)

Já foi demonstrado que o veneno desta serpente pode possuir atividade proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica (Tanaka et al., 2010). Entretanto, a maior parte do veneno é composta pelas proteínas de três dígitos (3FTX) e as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que são as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno (Ciscotto et al., 2011).

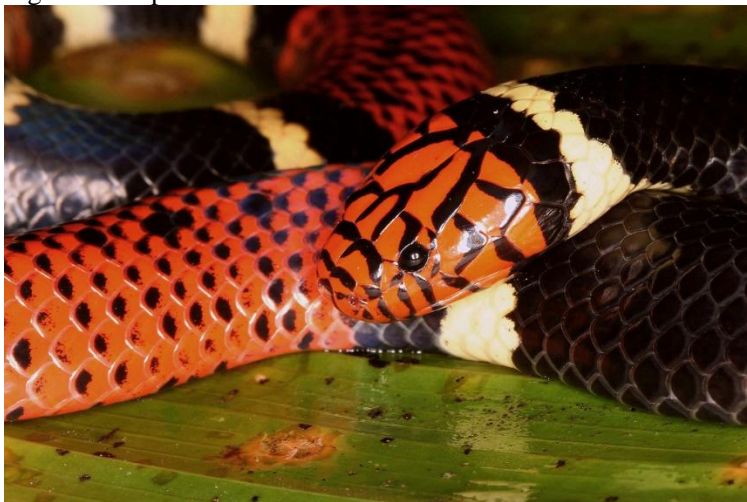
As toxinas de três dígitos (3FTX) ganham um destaque especial neste veneno, pois estão presentes em abundância e grande variedade. Essas proteínas são não enzimáticas, mas são capazes de afetar a transmissão

sináptica através da ligação aos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) (Moreira et al., 2010).

### 1.8 A ESPÉCIE *Micrurus surinamensis*

As serpentes da espécie *Micrurus surinamensis* possuem hábito aquático e se alimentam, principalmente, de peixes, mas não exclusivamente. Essa espécie pode ser identificada pelo padrão de cores na cabeça, onde possui escamas vermelhas e demarcadas pela cor negra (Figura 7) (Cardoso et al., 2003). Diversos estudos de caracterização toxicológica e enzimática têm demonstrado que a composição deste veneno é muito particular quando comparado ao de outras serpentes do gênero, o que sugere uma grande variação entre as espécies (Olamendi-Portugal et al., 2008).

Figura 7: Serpente *Micrurus surinamensis*.



Presença de escamas vermelhas demarcadas de preto na cabeça identificam a espécie.

Fonte: <http://www.fieldherpforum.com>

Assim como as outras serpentes do gênero, possui um veneno potencialmente neurotóxico, porém não existem muitos estudos a respeito dos seus outros componentes. Além disso, as poucas pesquisas a respeito da fisiopatologia e composição do veneno acabam por se contradizer quando se compara os resultados de testes *in vitro* e *in vivo*,



gerando dúvidas a respeito dos reais mecanismos de ação do veneno (Gutiérrez et al., 2016). De acordo com o proteoma realizado por Olamendi-Portugal et al., (2008), mais de 60% das proteínas presentes no veneno de *M. surinamensis* possuem massa molecular entre 6 e 8 kDa. Essas proteínas podem ser caracterizadas como proteínas de três dígitos (3FTX) pós-sinápticas e possuem uma forte ação neurotóxica pós-sináptica, bloqueando os receptores nicotínicos de acetilcolina.

Contudo, por ser uma serpente com hábitos muito diferentes das outras espécies é importante que se conheça e estude as proteínas que compõem a peçonha, pois nela podem estar presentes potenciais moléculas para diagnóstico, tratamento e usos farmacológicos. Além disso, é possível que o soro anti-elapídico não seja capaz de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno, uma vez que sua composição é muito diferente do padrão apresentado pelo gênero (Gutiérrez et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o veneno da serpente *Micrurus surinamensis* em comparação com *Micrurus frontalis* no âmbito bioquímico e imunoquímico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Determinar o perfil eletroforético dos venenos das serpentes *Micrurus surinamensis* e *Micrurus frontalis* através da técnica de SDS-PAGE;
- II- Determinar a dose letal média - DL50 do veneno de *M. surinamensis* em camundongos Swiss;
- III- Determinar a citotoxicidade média - EC50 de *M. surinamensis* e *M. frontalis* em células MGSO-3;
- IV- Avaliar e mensurar as atividades enzimáticas (Fosfolipase A2, Hialuronidase, L-aminoácido oxidase, Metaloprotease e Serinoprotease) dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*;
- V- Analisar as atividades de edema e nociceptiva do veneno de *M. surinamensis* e *M. frontalis* em camundongos Swiss;
- VI- Produzir um soro antiveneno de *Micrurus surinamensis* através da hiperimunização em coelhos New Zeland;
- VII- Analisar a capacidade dos soros comerciais (antielaipídico do Brasil, anticoral da Costa Rica) e dos soros produzidos em coelhos (antiveneno de *M. frontalis* e antiveneno de *M. surinamensis*) de reconhecerem os venenos em questão através de ELISA e Western Blot;
- VIII- Analisar se os soros comerciais e o soro produzido em coelhos são capazes de neutralizar as atividades tóxicas do veneno de *M. surinamensis* através do teste de neutralização da DL50.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS, VENENOS E SOROS

As amostras de veneno de *M. frontalis* e *M. surinamensis* utilizadas neste trabalho, foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Carlos Chávez do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras liofilizadas foram estocadas a -20 °C no escuro, até o seu uso.

Camundongos da linhagem Swiss machos, pesando de 18 a 22 gramas e coelhas fêmeas pesando cerca de 3 quilos foram mantidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil e no Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os animais receberam água e comida *ad libitum* em um ambiente com condições controladas. Os protocolos de experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (Protocolo nº 375/2012) e UNESC (Protocolo nº 012/2017-1).

Os antivenenos comerciais antielapidicos do Brasil e da Costa Rica foram gentilmente cedidos pelo Instituto Butantan e pelo Instituto Clodomiro Picado. Os soros foram estocados de 2-8 °C como recomendado pelo fabricante.

#### 3.2 ELETROFORESE SDS-PAGE

Para analisar o perfil eletroforético dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* foi utilizada a técnica de separação de proteínas por eletroforese SDS-PAGE. Amostras de veneno de *M. surinamensis* e *M. frontalis* foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, de acordo com o método proposto por Laemmli (1970). Foi utilizado gel de separação a 18% e gel de concentração a 4%. Diferentes quantidades das amostras (10, 20 e 40 µg) foram diluídas na proporção 1:1 em tampão de amostra (Tris-HCl 0,7M, pH 6,8, azul de bromofenol a 0,25% p/v, glicerol 10%v/v, β-mercaptoetanol 2,5% v/v e SDS 4%), homogeneizadas e fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada 30 minutos a 50V e o restante a 150V. Como padrão, foram utilizados os marcadores de massa molecular de proteínas ThermoScientific de baixa massa e de larga escala.

Para a coloração do gel, o método de coloração por prata foi realizado. O gel foi mergulhado em 100 mL de solução fixadora (50 mL de

metanol, 12 mL de ácido acético e 40 µL de formaldeído, em água deionizada) por toda à noite. Posteriormente a solução foi retirada e o gel lavado três vezes por sete minutos em água deionizada. Em seguida, o gel foi colocado em uma solução de tiosulfato de sódio 0,004% por um minuto. Após três ciclos de lavagem em água, o gel foi imerso em 100 mL de uma solução contendo 0,1 g de AgNO<sub>3</sub> e 75 µL de formaldeído em água deionizada. Uma rápida lavagem foi realizada para se colocar o gel na solução de desenvolvimento (6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6%p/v, 50 µL de formaldeído e 2 mL de tiosulfato de sódio em água deionizada). Após o aparecimento das bandas, o gel foi retirado da solução e a reação interrompida pela solução de parada (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético em água deionizada).

### 3.3 DOSE LETAL MÉDIA (DL<sub>50</sub>)

Para a determinação da letalidade do veneno de *M. surinamensis*, foi calculada a dose letal capaz de matar metade dos animais que foram injetados com aquela quantidade de veneno (DL<sub>50</sub>). Para isso, grupos com oito camundongos Swiss pesando de 18 a 22 g receberam injeções via intraperitoneal com diferentes doses de veneno (de 0,5 a 1,0 mg/kg) diluído em 0,5 mL de PBS-BSA 0,1%. Após 24 horas as mortes em cada grupo foram contabilizadas e a DL<sub>50</sub> calculada usando o programa de análise Probit (Finney, 1971). Para a determinação da DL<sub>50</sub> do veneno de *M. frontalis* foram utilizados os dados de Castro et al, (2015) a fim de reduzir o número de animais utilizados neste trabalho.

### 3.4 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos venenos das serpentes *M. surinamensis* e *M. frontalis* foi testada utilizando o reagente AlamarBlue, segundo metodologia descrita por Damico et al., (2007), com consideráveis modificações. Após contagem na câmara de Neubauer, as células MGSO-3 foram plaqueadas, em DMEM completo (DMEM + 10% de SFB), em placa de 96 poços, na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço e mantidas a 37°C e em atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, o meio foi removido e as células incubadas com diferentes concentrações dos venenos, em DMEM incompleto (DMEM sem SFB). Após 24 horas, o meio foi removido e o reagente AlamarBlue adicionado (10% em DMEM) às células, deixando a placa incubada por 3 horas a 37°C no escuro. Foram coletados 100 µL de cada poço,

transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura dos valores de fluorescência foi realizada a 540nm (excitação) e 590nm (emissão) em fluorímetro (Synergy 2, Bio-tek). A porcentagem da viabilidade celular foi calculada considerando o controle não tratado como 100% viável. Foi feito também um controle negativo (sem células) e o valor de sua fluorescência foi subtraído do valor de fluorescência de todas as amostras. O cálculo foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{VIABILIDADE CELULAR (\%)} = (\text{FL590 AMOSTRA}) / (\text{FL590 CONTROLE NÃO TRATADO}) \times 100$$

A concentração efetiva capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular, ou dose citotóxica 50 (DC50), foi determinada a partir de curva de concentração-resposta, utilizando o software GraphPadPrism 5. Os resultados foram expressos em média de três experimentos independentes.

### 3.5 ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA

Para a quantificação da atividade de hialuronidase, uma curva de diluição de 120 a 0,625 µg dos venenos (*M. surinamensis* e *M. frontalis*) e tampão acetato (0,2 M de acetato de sódio/ácido acético e 0,15 M de NaCl, pH 6,0) foi incubada com 12,5 µg de ácido hialorônico (HA) em uma placa de 96 poços (Horta et al, 2014, com modificações). Uma curva controle foi realizada com 5 pontos de concentrações conhecidas de HA, correspondendo a 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de atividade hialuronidásica. A placa foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Após a incubação, 200 µL de uma solução contendo 2,5% (w/v) de CTAB dissolvido em NaOH foi adicionado a cada poço. A turbidez produzida foi medida a 405 nm em leitor de microplaca Biorad 680. Todo o ensaio foi realizado em duplicata. Os resultados foram expressos em média de três experimentos independentes em uma curva dose-resposta e os valores de 50% de atividade foram mensurados.

### 3.6 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Para a quantificação da atividade de Fosfolipase A2 (PLA2) o Kit EnzChek® (Life Technologies) foi utilizado. O experimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit, usando 2 µg dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*. Uma

solução de PLA2 purificada do veneno de abelha (10 unidades/mL) em adição ao tampão de reação foi utilizada como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada a mesma solução, porém sem a PLA2 purificada. Foram realizados três experimentos independentes, onde todos os ensaios foram realizados em duplicata. Foi calculada a porcentagem média de atividade de acordo com o resultado do controle positivo.

### 3.7 ATIVIDADE DE *L*-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO)

Para quantificar a atividade de LAAO, 2 µg dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* foram incubados com uma solução contendo *L*-leucina, que funciona como o substrato da enzima. Também são adicionados 2 mM de OPD e peroxidase (5 U/mL) em tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) em placas de 96 poços a 37 °C. Após uma hora de incubação, a reação foi parada pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A reação é medida através da intensidade da absorbância a 490 nm por leitor de microplacas Biorad 680. Os resultados são expressos em unidade através da média de três experimentos independentes, onde uma unidade de atividade de LAAO é equivalente a quantidade de veneno que produz 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

### 3.8 PRODUÇÃO DO SORO ANTIVENENO DE *M. surinamensis*

Duas fêmeas adultas de coelhos New Zealand (2.0 – 2.5 kg) foram utilizadas para produção de anticorpos antiveneno de *M. surinamensis*. Após coletar soro pré-imune, os animais receberam uma injeção inicial de 100 µg de veneno com adjuvante completo de Freund's, por via subcutânea. Três reforços foram realizados subcutaneamente 14, 21 e 28 dias após a primeira dose com uma quantidade menor de veneno (50 µg) em adjuvante incompleto de Freund's. Após uma semana de finalização do ciclo de imunização, o sangue dos animais foi coletado e centrifugado para a obtenção do soro para posteriores testes.

### 3.9 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Com o intuito de avaliar o reconhecimento dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* pelos soros comerciais do Brasil e Costa Rica, pelo soro antiveneno de *M. surinamensis* e também pelo soro antiveneno de *M. frontalis*, um dos testes utilizados foi o ELISA. Para

tal, placas flexíveis de microtitulação (BD Biosciences, USA) foram sensibilizadas e permaneceram por toda noite a 5 °C com 100 µL de uma solução de tampão carbonato pH 9.6 contendo 10 g/mL dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*. Após lavagem com solução salina contendo 0,05% de Tween, os poços foram bloqueados com caseína 2% em PBS por 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados novamente e em seguida foram adicionados, em diferentes diluições, os soros a serem testados: pré-imune e imune dos coelhos imunizados com veneno de *M. surinamensis*, soro antiveneno de *M. frontalis*, soro comercial produzido no Brasil e soro comercial produzido na Costa Rica. As placas foram incubadas novamente por 1 hora a 37 °C. Após uma nova lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram adicionados, sendo uma anti-IgG de coelho para o soro antiveneno de *M. surinamensis* e *M. frontalis*, e anti-IgG de cavalo para os soros comerciais. Uma nova incubação por 1 hora a 37 °C foi realizada. Após lavagem das placas, foram adicionados 100 µL de OPD) (o-fenilenediamina) (0,33 mg/ml em tampão citrato, pH 5,2, na presença de 0,04% de peróxido de hidrogênio). A reação foi parada após 20 minutos pela adição de 20 µL de uma solução de ácido sulfúrico (1:20). Os valores de absorbância foram determinados a 492 nm usando leitor de microplacas (BIO-RAD, 680). Os valores de absorbância obtidos com o soro pré-imune de coelho foram subtraídos dos valores dos soros imunes. Os experimentos foram feitos em duplicata e as médias calculadas.

### 3.10 WESTERN BLOT

Com o intuito de avaliar o reconhecimento proteico dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* pelos soros pré-imune de coelho, antiveneno de *M. surinamensis*, antiveneno de *M. frontalis*, comercial do Brasil e da Costa Rica foi utilizada, também, a técnica de Western-Blot. Primeiramente foi realizada a eletroforese SDS-PAGE conforme já descrito anteriormente, com a utilização de 20 µg de cada veneno aplicados em cinco canaletas, uma para cada soro a ser utilizado. Após a corrida o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Adicionou-se uma solução de Ponceau para visualização das bandas transferidas para a membrana. Cada faixa da corrida correspondente a um veneno foi cortada e separada em potes para posterior análise com os soros de interesse. As partes da membrana foram bloqueada por 1 hora com PBS contendo 0,35% de Tween. Depois de três lavagens de 5

minutos com PBS-Tween 0,05%, cada parte da membrana foi incubada por 1 hora e 30 minutos com os soros a serem testados. As membranas foram lavadas (PBS-Tween 0,05%) mais três vezes e então incubadas por 1 hora com anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cavalo conjugada com peroxidase. Após três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0.05%, as proteínas imunorreativas foram detectadas utilizando uma solução de DAB/cloronaftol de acordo com as instruções do fornecedor.

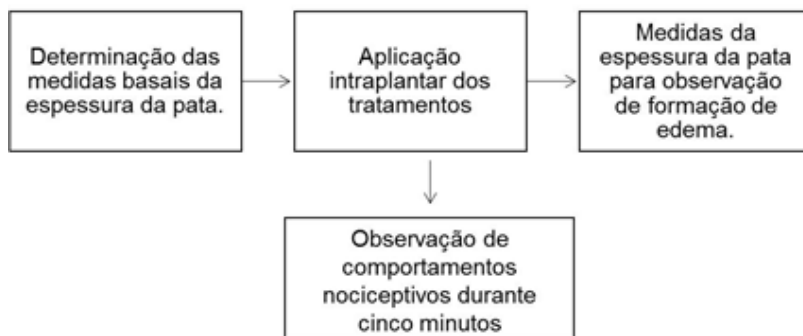
### 3.11 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DE EDEMA E NOCICEPÇÃO

Com a intenção de observar se os venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* são capazes de produzir edema e dor (nocicepção) foi realizado um ensaio que consiste na injeção de veneno na pata de camundongos. Neste experimento foram utilizados três grupos experimentais (*M. surinamensis*- 0,175 mg/kg; *M. frontalis*- 0,175 mg/kg; Controle (PBS)), compostos cada um por seis animais, totalizando 18 animais. A avaliação da atividade edematogênica foi realizada por meio da determinação das medidas basais da espessura da pata e após administração intraplantar (pata traseira direita) do veneno de *Micrurus surinamensis*, *M. frontalis* e de PBS. Para observação da formação de edema, foram medidas as espessuras das patas injetadas através de um paquímetro após 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 420 minutos da aplicação dos venenos e PBS. Os resultados foram expressos em média da variação ( $\Delta$ ) da espessura da pata em milímetros (mm).

Para avaliação da atividade nociceptiva foi realizada a observação dos animais logo após a aplicação do veneno na pata traseira direita, cronometrando-se durante um período de 5 minutos os sinais de dor (lambida da pata, balançar ou bater a pata no ar ou no chão e manter a pata levantada) demonstrados pelos camundongos. Os resultados são expressos em média do total de segundos que os animais apresentaram sinais de dor. A Figura 8 resume o desenho experimental deste experimento.



Figura 8: Desenho experimental do experimento de avaliação de dor e edema.



Fonte: Autor

### 3.12 NEUTRALIZAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LETAL

Para ensaios de soroneutralização *in vitro*, 20 camundongos Swiss foram divididos em 5 grupos, uma para cada soro a ser testado (pré-imune e imune de coelho, comercial Brasil, comercial Costa Rica) e um controle negativo (PBS). Nos grupos testados com os soros de coelho, cada animal recebeu por via intraperitoneal 500µL de solução contendo 100µL de soro, pré-incubado a 37 °C com 2 DL50 do veneno de *M. surinamensis* em PBS-BSA 0,1% por uma hora. Os animais do grupo controle negativo foram inoculados apenas com PBS-BSA 0,1%.

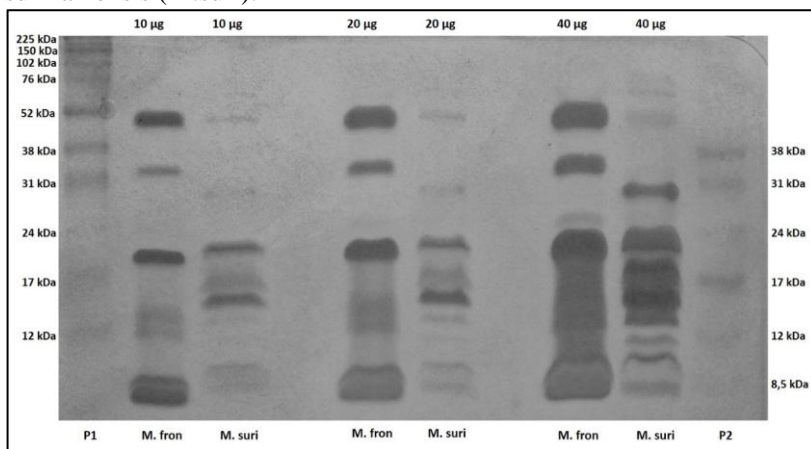
Já nos grupos testados com os soros comerciais, foram utilizadas as quantidades preconizadas pelos fabricantes do antiveneno. No caso do soro antielapídico produzido pelo Butantan, cada mL de soro teria de ser capaz de neutralizar 1,5 mg de veneno. Em se tratando do soro produzido pelo Instituto Clodomiro Picado, cada mL de soro deve ser capaz de neutralizar 0,3 mg de veneno. Os resultados foram quantificados em até 48 horas após a inoculação, onde se contabilizou as mortes dos animais de cada grupo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PERFIL ELETROFORÉTICO

Para possibilitar a visualização geral do conteúdo proteico dos venenos de *Micrurus surinamensis* e *M. frontalis* foi realizada a eletroforese SDS-PAGE com 18% de acrilamida. A Figura 9 mostra o perfil eletroforético de *M. surinamensis* e *M. frontalis* (utilizado para fins de comparação) em diferentes concentrações. Foram aplicados 10, 20 e 40 µg dos venenos. Verifica-se que, diferente de *M. frontalis*, o veneno de *M. surinamensis* possui uma grande parte de suas moléculas entre 12 e 24 kDa, não apresentando bandas acima de 31 kDa. As amostras utilizadas foram preparadas em condições redutoras e o gel foi corado pela prata.

Figura 9: Perfil eletroforético dos venenos de *M. frontalis* (M.fron) e *M. surinamensis* (M.suri).



Perfil eletroforético dos venenos de *M. frontalis* (M.fron) e *M. surinamensis* (M.suri). O gel de poliacrilamida 18% correu em tampão Tris-Glicina de acordo com Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras contendo 10, 20 e 40 µg de veneno. O gel foi corado pela prata. P1 é o padrão de massa molecular de larga escala e P2 é o padrão de baixa massa.

### 4.2. DOSE LETAL MÉDIA (DL50)

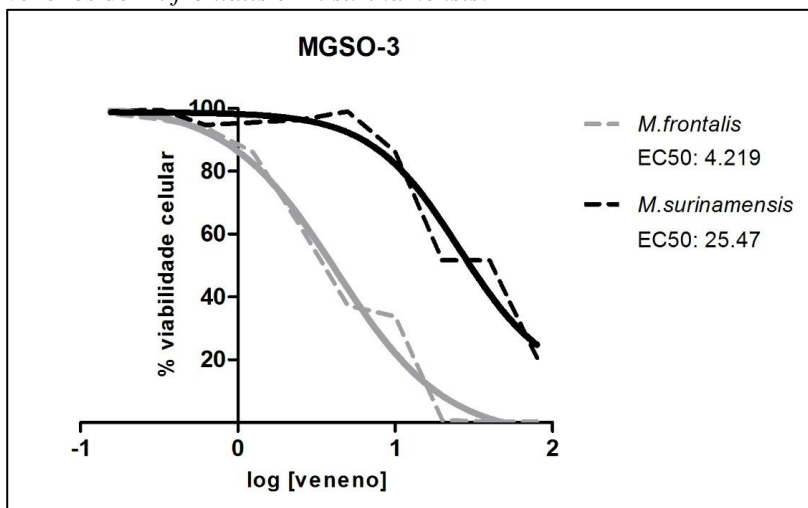
Para a avaliação da toxicidade do veneno de *M. surinamensis*, o primeiro ensaio a ser realizado foi a determinação da DL<sub>50</sub> em

mamíferos, utilizando camundongos Swiss. Após injeção intraperitoneal (i.p.) do veneno, foram observados sintomas típicos de envenenamento elapídico, como letargia e dificuldade respiratória. O valor da  $DL_{50}$  foi determinado como 0,75 mg/kg de massa corporal de camundongo. O valor da  $DL_{50}$  de *M. frontalis* encontrado por Castro e et al., (2015) foi de 0,69 mg/kg.

#### 4.3. CITOTOXICIDADE

Com a intenção de continuar a avaliação da toxicidade do veneno, um ensaio de citotoxicidade utilizando AlamarBlue foi realizado em células MGSO-3. Utilizando diluições seriadas (80 mg/mL a 1,25 mg/mL) os venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* foram adicionados às placas contendo uma quantidade conhecida de células. Os dois venenos foram capazes de reduzir a viabilidade celular, embora, de acordo com a Figura 10, o veneno de *M. frontalis* se demonstrou mais citotóxico que o de *M. surinamensis*. A  $EC_{50}$  de cada veneno está representada na Figura 10.

**Figura 10:** Viabilidade celular das células MGSO-3 após 24h de tratamento com diferentes concentrações (80 mg/mL a 1,25 mg/mL) dos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis*.

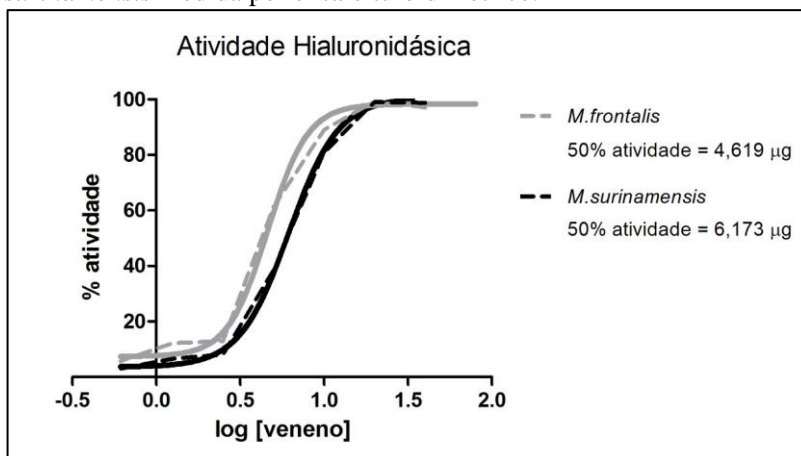


A viabilidade foi testada por AlamarBlue e os resultados estão expressos em curva dose-resposta da média de três experimentos independentes

#### 4.4. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA

A presença de algumas atividades enzimáticas foi investigada. Dentre elas, a primeira determinada foi a atividade hialuronidásica. Os ensaios foram realizados utilizando uma solução padrão de ácido hialurônico e diferentes doses dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*. Os resultados são expressos em quantidade de veneno que é necessário para degradar 50% do ácido hialurônico presente na solução. De acordo com os resultados, expressos na Figura 11, o veneno de *M. surinamensis* possui uma menor atividade hialuronidásica quando comparado ao veneno de *M. frontalis*.

Figura 11: Atividade hialuronidásica dos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* medida por ensaio turbidimétrico.



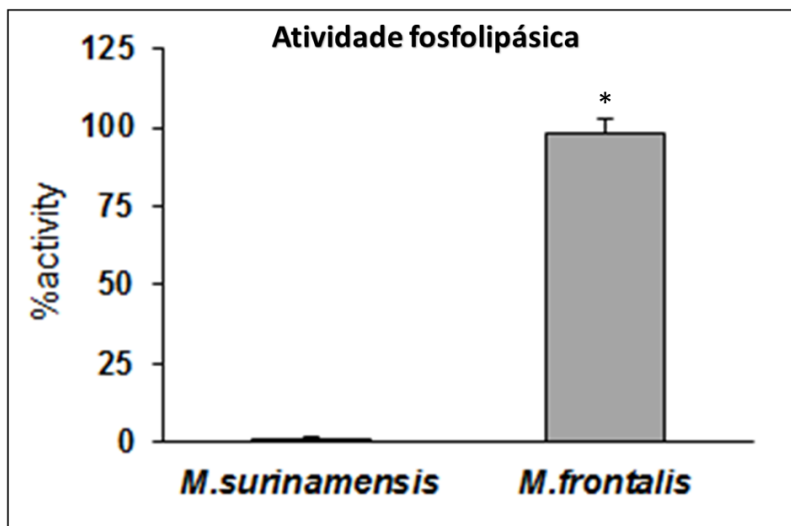
Os dados representam a quantidade média de veneno necessária para degradar 50% do ácido hialurônico presente na solução padrão.

#### 4.5. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Também foi mensurada a atividade fosfolipásica dos venenos estudados com o auxílio do kit EnzChek<sup>®</sup>, que utiliza uma solução de PLA<sub>2</sub> padrão para o teste. Conforme determina o fabricante, foi utilizado apenas uma concentração dos venenos (2 µg) para identificar se a atividade fosfolipásica se faz presente nas peçonhas de *M. surinamensis* e *M. frontalis*. Como pode ser observado na Figura 12, o veneno de *M. surinamensis* não apresentou nenhuma atividade fosfolipásica, ao

contrário de *M. frontalis* que demonstrou possuir uma grande quantidade desta enzima.

Figura 12: Atividade fosfolipásica dos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis*.

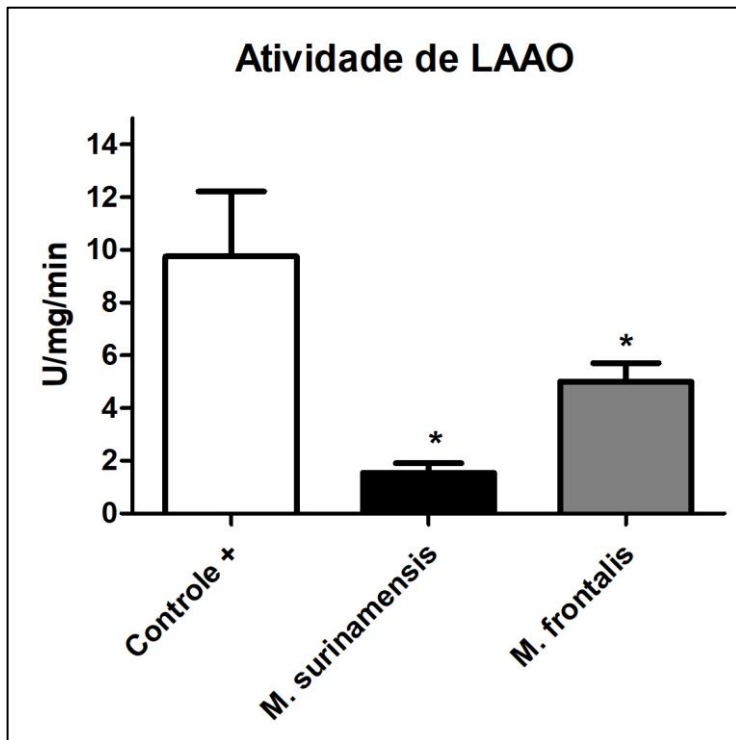


Os dados mostram a porcentagem de atividade em relação ao controle positivo (PLA2 padrão). Um asterisco (\*) determina diferença significativa entre o veneno de *M. surinamensis* e *M. frontalis*. \* $p < 0,05$

#### 4.6. ATIVIDADE DE *L*-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO)

Para a avaliação desta última atividade enzimática, foi utilizado o aminoácido *L*-leucina como substrato e uma quantidade fixa de 2 µg de cada um dos venenos. Os resultados são expressos em unidade, onde uma unidade de atividade de LAAO é equivalente a quantidade de veneno que produz 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto. Como pode ser visto na Figura 13, o veneno de *M. surinamensis* possui uma quantidade baixíssima de atividade de LAAO enquanto que o veneno de *M. frontalis* possui uma maior atividade.

Figura 13: Atividade de LAAO dos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis*.



Os dados são expressos em unidade e comparados a um controle positivo. Um asterisco (\*) determina diferença significativa entre os grupos dos venenos e controle positivo.  $*p < 0,05$

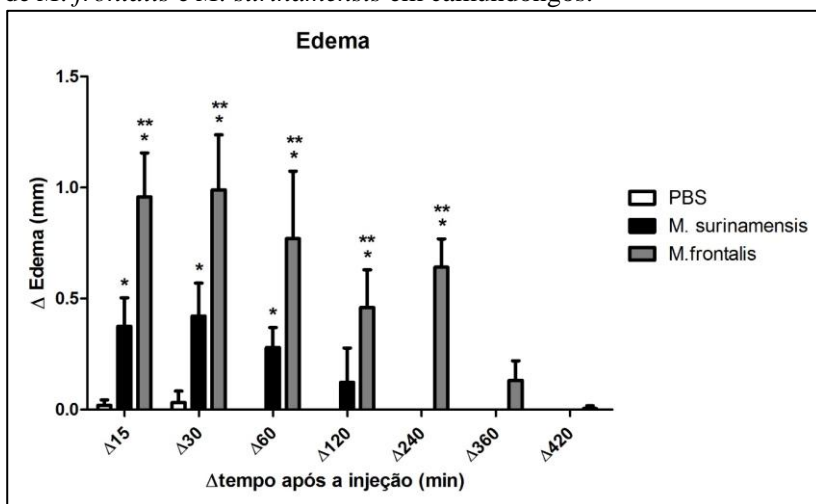
#### 4.7. ATIVIDADES DE EDEMA E NOCICEPÇÃO

Com o intuito de observar se os venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* são capazes de provocar edema e dor (nocicepção) ao serem inoculados em mamíferos, camundongos Swiss tiveram esses venenos injetados em sua pata direita traseira. Antes de injetar as soluções de venenos e PBS (controle), todos os animais tiveram a espessura de sua pata direita traseira medida, sendo esta considerada a medida basal. Após a injeção, os animais foram observados durante 5 minutos para a avaliação e cronometragem da duração de comportamentos de dor. Após 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 420 minutos da injeção das soluções, as espessuras das patas foram medidas

novamente para o cálculo do edema. O edema da pata é expresso como a diferença ( $\Delta$ ) das espessuras da pata (mm) após a injeção dos venenos ou PBS em relação à medida basal.

Como pode ser observado na Figura 14, a partir de 15 minutos os animais injetados tanto com o veneno de *M. surinamensis* quanto os injetados com *M. frontalis*, já apresentavam edema de pata significativo. O veneno de *M. surinamensis* foi capaz de produzir um edema mais brando e menos duradouro quando comparado ao veneno de *M. frontalis*, que teve como seu pico máximo um  $\Delta$  de cerca de 1 mm, enquanto que o  $\Delta$  de *M. surinamensis* não chegou a 0,5 mm. Com relação ao tempo de duração do edema, os animais injetados com o veneno de *M. frontalis* continuaram apresentando edema até a medida de 240 minutos, enquanto que no grupo de *M. surinamensis*, este edema esteve presente até a medida feita 60 minutos após a injeção.

Figura 14: Edema de pata causado pela injeção dos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* em camundongos.

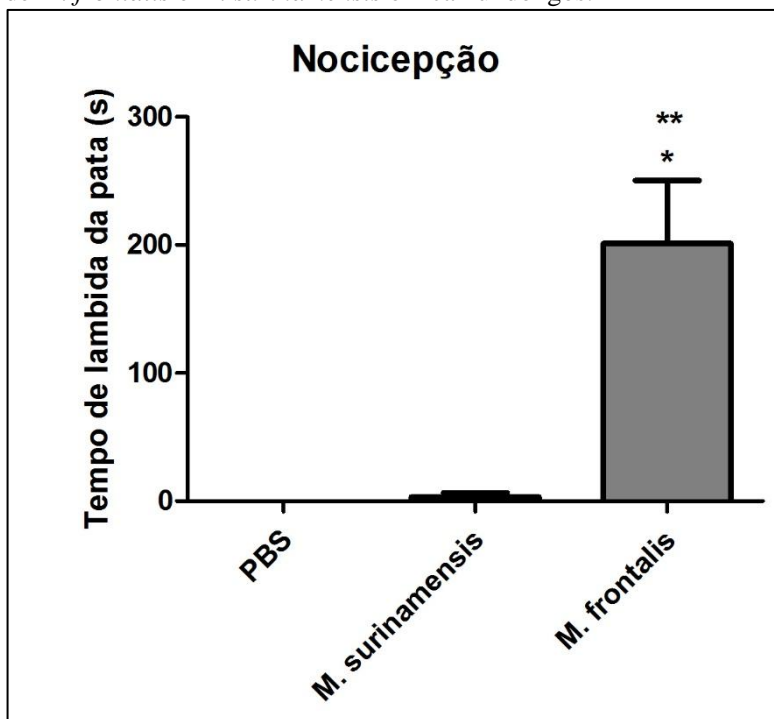


Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Um asterisco (\*) determina diferença significativa entre o grupo de veneno e controle (PBS). Dois asteriscos (\*\*) significa diferença significativa entre o grupo dos venenos. \* $p < 0,01$

Ao se tratar da dor, foi possível observar que os animais injetados com o veneno de *M. frontalis* apresentaram uma nocicepção contínua e significativa. O comportamento de lambida da pata começou

imediatamente após a injeção do veneno. Outros comportamentos de nocicepção também foram observados como manter a pata encolhida/levantada e “bater” com a pata no ar. Já os animais injetados com o veneno de *M. surinamensis* não apresentaram uma nocicepção significativa (Figura 15).

Figura 15: Tempo de lambida da pata causado pela injeção dos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* em camundongos.



Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Um asterisco (\*) determina diferença significativa entre o grupo de veneno e controle (PBS). Dois asteriscos (\*\*) significa diferença significativa entre o grupo dos venenos.  $P < 0,01$

#### 4.8. PRODUÇÃO DE SORO ANTI-*M. surinamensis*

Conforme já mencionado, a técnica utilizada para a produção de soro anti-*M. surinamensis* foi a imunização com o veneno total de *M. surinamensis* em coelhos New Zeland. Após encerrados os ciclos de

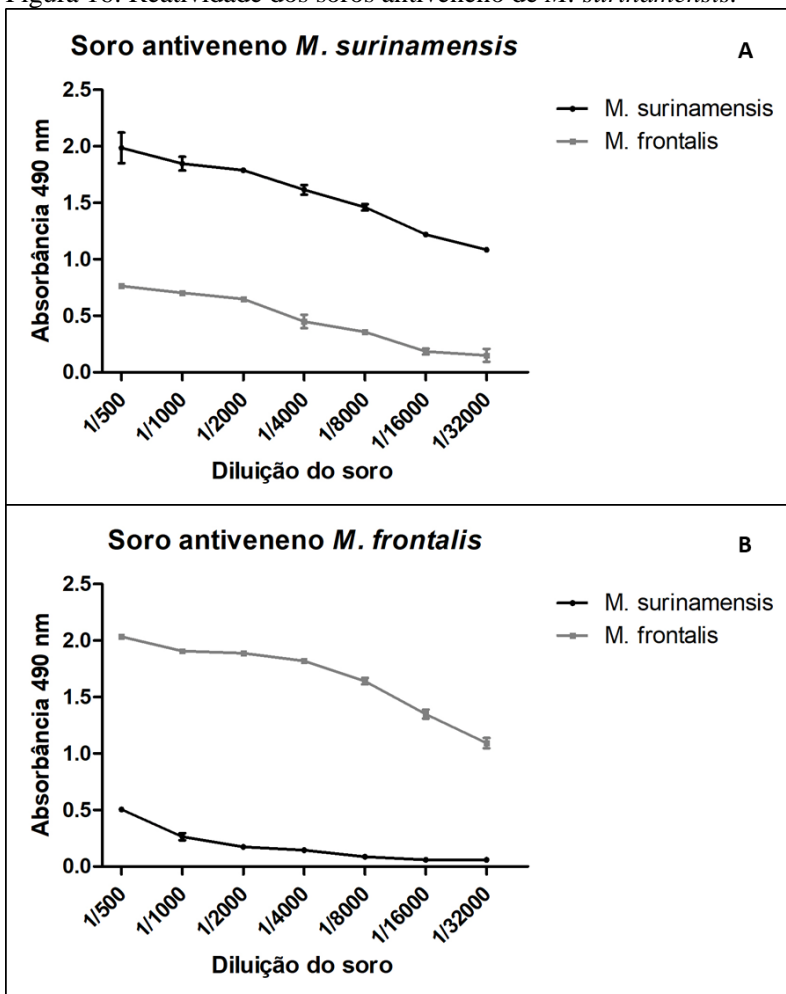


imunização, os coelhos foram submetidos à sangria para obtenção do soro com os anticorpos. Para avaliar a produção de anticorpos foi utilizado os testes de ELISA e Western Blot conforme será descrito na sequência.

#### 4.9. *ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)

A fim de avaliar a produção de anticorpos antiveneno de *M. surinamensis* pela imunização de coelhos, o teste de ELISA foi utilizado. O mesmo teste também foi empregado para avaliar a reatividade de diferentes soros (antielaipídico do Brasil, anticoral da Costa Rica e antiveneno de *M. frontalis*) frente aos venenos estudados.

Como pode ser observado na Figura 16A, a imunização dos coelhos foi capaz de induzir a produção de anticorpos antiveneno de *M. surinamensis*, uma vez que o soro apresentou uma alta reatividade quando testado com o veneno correspondente. Entretanto, quando testado com veneno de *M. frontalis*, o soro não apresentou um reconhecimento considerável. Da mesma forma, ao se testar o soro antiveneno de *M. frontalis* foi observado sua capacidade de reconhecer significativamente seu veneno correspondente e fracamente o veneno de *M. surinamensis* (Figura 16B).

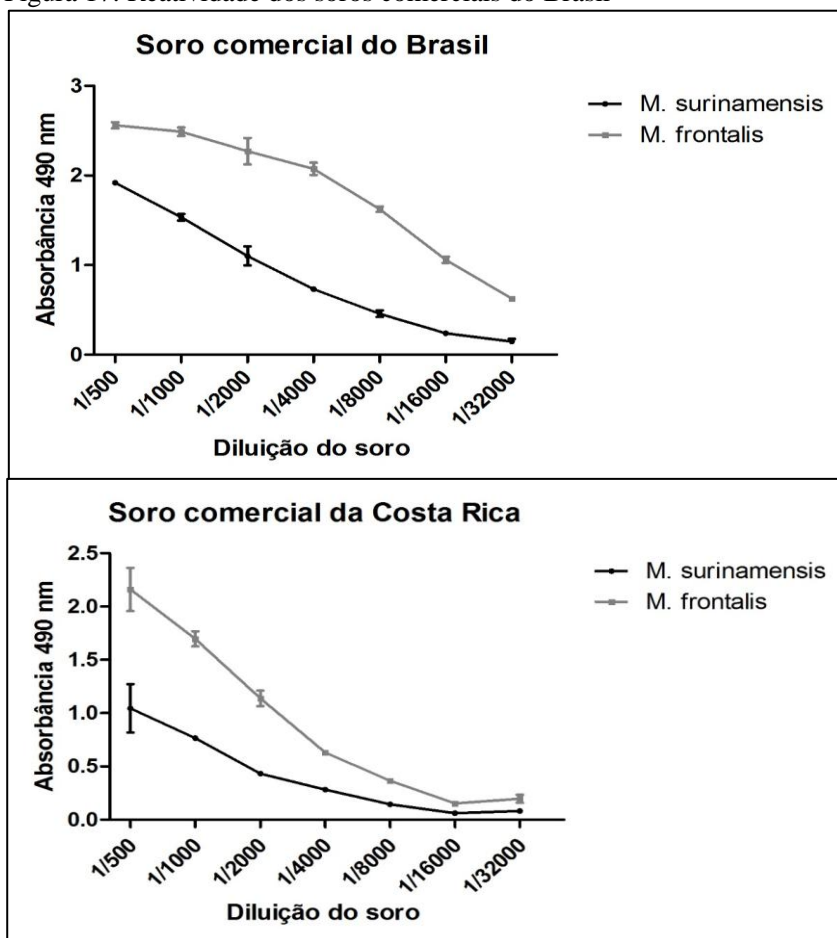
Figura 16: Reatividade dos soros antiveneno de *M. surinamensis*.

(A) e antiveneno de *M. frontalis* (B) frente aos mesmos venenos através do teste de ELISA.

Com a intenção de avaliar o reconhecimento dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* por soros comerciais, os soros antielapídico produzido no Instituto Butantan do Brasil e o anticorral do Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica também foram testados. Foi observado que o soro comercial do Brasil é capaz de reconhecer fortemente os dois venenos, sendo que uma maior reatividade pode ser encontrada em

relação ao veneno de *M. frontalis* (Figura 17A). Já o soro comercial da Costa Rica apresentou uma forte reatividade com o veneno de *M. frontalis* e uma média reatividade com o veneno de *M. surinamensis*, que exibiu apenas cerca de metade do reconhecimento de *M. frontalis* frente ao mesmo soro (Figura 17B).

Figura 17: Reatividade dos soros comerciais do Brasil



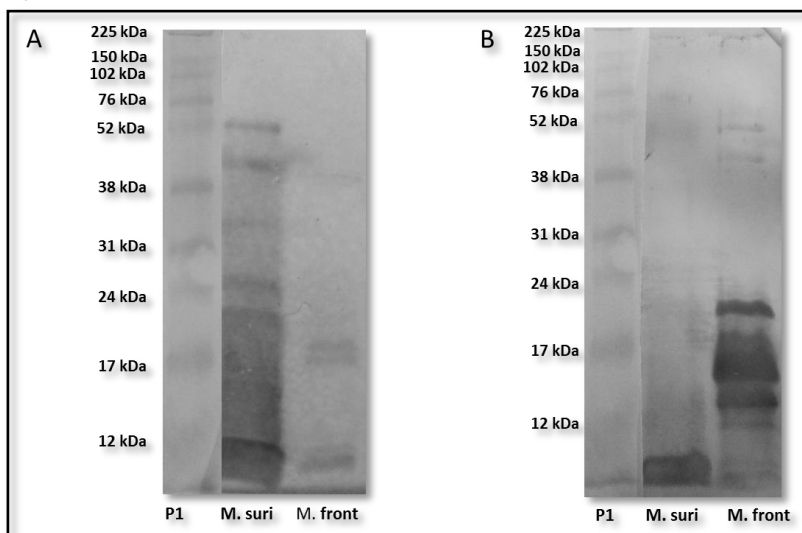
(A) e Costa Rica (B) frente aos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* através do teste de ELISA.

#### 4.10. WESTERN BLOT

Para avaliar o reconhecimento das proteínas dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*, foi realizada a técnica de Western Blot, conforme já descrito. Foram aplicados 20 µg de cada veneno e, após a eletroforese (gel 18%), o padrão foi cortado e o restante da membrana foi submetida ao imunoensaio. Foram testados os soros pré-imune de coelho, antiveneno de *M. surinamensis* e *M. frontalis* e os soros comerciais do Brasil e Costa Rica nas diluições de 1:1000. Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cavalo conjugadas com peroxidase na diluição de 1:8000.

Ao se testar o soro antiveneno de *M. surinamensis*, o Western Blot revelou que a grande maioria das proteínas do veneno de *M. surinamensis* visualizadas no gel é imunogênica, uma vez que a maior parte das bandas detectadas por SDS-PAGE foram reconhecidas pelo soro imune de coelho. Entretanto, o veneno de *M. frontalis* é fracamente reconhecido por este soro, e em apenas algumas bandas de proteínas (Figura 18A). De forma semelhante, quando o soro antiveneno de *M. frontalis* é utilizado, seu veneno correspondente é fortemente reconhecido nas bandas que apresentaram uma maior quantidade de proteínas na eletroforese, já o veneno de *M. surinamensis* é reconhecido em apenas uma região (Figura 18B).

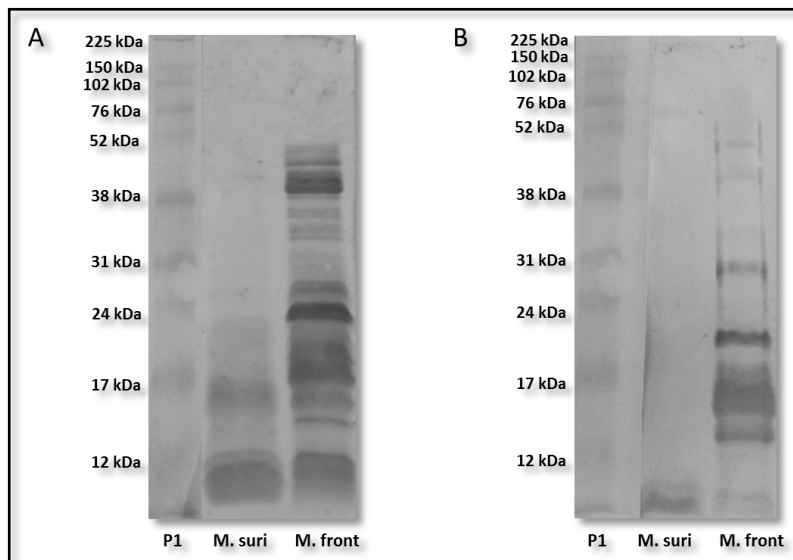
Figura 17: Western Blot dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*.



Os venenos (20  $\mu$ g) foram submetidos a eletroforese em gel com 18% de acrilamida. Os soros de coelho antiveneno de *M. surinamensis* (A) e antiveneno de *M. frontalis* (B) foram utilizados na diluição de 1:1000 e a IgG de coelho conjugada com peroxidase foi utilizada na diluição de 1:8000

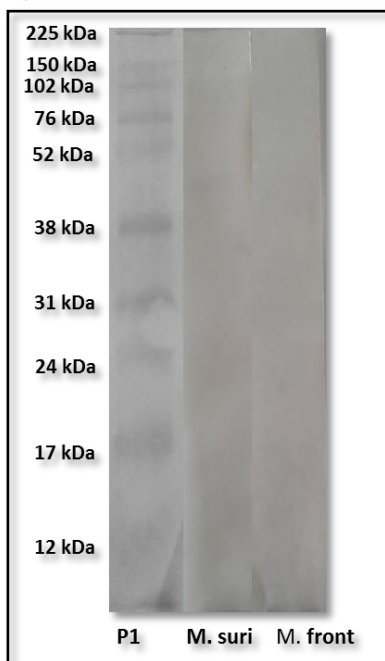
Quando os soros comerciais foram testados pode-se observar um resultado semelhante ao encontrado no teste de ELISA. O soro comercial produzido no Brasil foi capaz de reconhecer fortemente a grande maioria das bandas do veneno de *M. frontalis* e mais fracamente as bandas com baixa massa molecular do veneno de *M. surinamensis* (Figura 19A). Já o soro produzido na Costa Rica foi capaz de reconhecer fortemente algumas bandas do veneno de *M. frontalis*, mas praticamente não reconheceu o veneno de *M. surinamensis* (Figura 19B). O soro pré-imune de coelho não foi capaz de reconhecer nenhuma banda dos venenos testados (Figura 20).

Figura 18: Western Blot dos venenos de *M. surinamsnsis* e *M. frontalis*.



Os venenos (20 µg) foram submetidos a eletroforese em gel com 18% de acrilamida. Os soros comerciais do Brasil (A) e da Costa Rica (B) foram utilizados na diluição de 1:1000 e a IgG de cavalo conjugada com peroxidase foi utilizada na diluição de 1:5000.

Figura 19: Western Blot dos venenos de *M. surinamsnsis* e *M. frontalis*.



Os venenos (20 µg) foram submetidos a eletroforese em gel com 18% de acrilamida. O soro pré-imune de coelho foi utilizado na diluição de 1:1000 e a IgG de coelho conjugada com peroxidase foi utilizada na diluição de 1:8000.

#### 4.11. NEUTRALIZAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LETAL

Para a realização da soroneutralização *in vitro*, o veneno de *M. surinamensis* foi pré-incubado com os soros pré-imune de coelho, antiveneno de *M. surinamensis*, comercial do Brasil e comercial da Costa Rica. As soluções foram, então, injetadas via intraperitoneal em camundongos Swiss. As mortes foram contabilizadas até 48 horas após a injeção.

Como pode ser visto na Tabela 2, o soro pré-imune de coelho não foi capaz de impedir a morte de nenhum dos animais injetados com o veneno de *M. surinamensis*. Tanto o soro comercial do Brasil quanto o da Costa Rica foram capazes de neutralizar 50% das mortes dos animais. Já o soro que foi produzido nos coelhos antiveneno de *M. surinamensis*

foi capaz de neutralizar 100% das mortes dos camundongos. Todos os animais que foram injetados apenas com PBS sobreviveram.

**Tabela 2** - Soroneutralização do veneno de *M. surinamensis* em camundongos Swiss. Representação da quantidade e porcentagem de mortes em cada grupo.

	<b>Morte/animais injetados</b>	<b>% morte</b>
Soro pré-imune de coelho + veneno de <i>M. surinamensis</i>	4/4	100%
Soro comercial Brasil + veneno de <i>M. surinamensis</i>	2/4	50%
Soro comercial Costa Rica + veneno de <i>M. surinamensis</i>	2/4	50%
Soro anti-veneno <i>M. surinamensis</i> + veneno de <i>M. surinamensis</i>	0/4	0%
PBS (controle negativo)	0/4	0%



## 4 DISCUSSÃO

Com base em alguns dados epidemiológicos sobre o acidente com serpentes em humanos, estima-se que ocorram cerca de 5,4 milhões de acidentes por ano, causando, em média, 125 mil mortes em todo o mundo. No Brasil, o envenenamento por serpentes ocorre com frequência e com grande severidade, se tornando, assim, um problema de saúde pública (Ciscotto et al., 2011). Só no ano de 2014 em nosso país, foram notificados mais de 22 mil casos de envenenamento pelas serpentes dos gêneros de maior importância epidemiológica (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*) (Ministério da Saúde, 2016).

Mesmo possuindo o menor número de casos entre os principais gêneros no Brasil, as serpentes do gênero *Micrurus* possuem um veneno com um alto potencial tóxico, fazendo com que seu envenenamento seja considerado potencialmente grave (Ministério da Saúde, 2001). As cobras corais, como são popularmente chamadas, tem uma grande distribuição geográfica por todo continente americano, habitando os mais diversos ambientes, como florestas tropicais, planícies e até desertos. A maioria das corais tem hábitos subfossoriais, entretanto algumas espécies como *M. surinamensis* e *M. lemniscatus*, são semi-aquáticas (Tanaka et al., 2010).

Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* possuem uma grande quantidade de neurotoxinas de baixa massa molecular, conhecidas como toxinas de três dígitos (3FTX). Essas toxinas têm como principal papel o bloqueio da sinapse na junção neuromuscular através da ligação aos receptores colinérgicos nicotínicos localizados na placa neuromuscular (De Oliveira et al., 2000, Urdaneta et al., 2004). Outras proteínas bastante presente nesses venenos são as fosfolipases A<sub>2</sub> que são as principais responsáveis pelos efeitos miotóxicos, hemorrágicos, inflamatórios e de neurotoxicidade pré-sináptica (Gutiérrez et al., 1983; Francis et al., 1997; Tambourgi et al., 1994; Goularte et al., 1995; Urdaneta et al., 2004).

Embora sejam muito importantes, os estudos envolvendo a bioquímica e a fisiologia desses venenos são escassos. Isso ocorre principalmente pela dificuldade de identificação das espécies, da extração de veneno e da manutenção dos animais em cativeiro (Aird e Da Silva, 1991, Tanaka et al., 2010). Desta forma, o objetivo pretendido com este trabalho foi de caracterizar bio e imunoquimicamente o veneno de *Micrurus surinamensis* em comparação com o veneno de *Micrurus frontalis*.

Quando se pretende realizar uma caracterização bioquímica inicial de um veneno, parte-se inicialmente de ensaios que envolvem a análise da composição deste veneno. Sendo assim, primeiramente foi realizado uma eletroforese SDS-PAGE para verificação do perfil proteico do veneno de *M. surinamensis* e comparados ao do veneno de *M. frontalis*. Assim, corroborando aos resultados demonstrados por Tanaka et al., em 2010, ambos venenos apresentaram bandas proteicas na faixa inferior a 70 kDa. Entretanto, assim como o trabalho de Tanaka et al., (2010), o veneno de *M. surinamensis* apresenta um perfil proteico muito diferente do perfil padrão do gênero, aqui representado pelo veneno de *M. frontalis*. O veneno de *M. surinamensis* possui uma alta concentração de proteínas abaixo de 24 kDa, não apresentando bandas acima de 31 kDa.

Acredita-se que o motivo desta grande variação do perfil eletroforético entre os dois venenos se deve a diferença das necessidades das duas serpentes, como por exemplo, seus hábitos alimentares. De acordo com o trabalho de Daltry et al., em 1996, a dieta das serpentes está significativamente relacionada com a variação das peçonhas. Jorge da Silva e Aird (2001) determinaram em seu trabalho que tanto a filogenia como a seleção genética influenciam na composição dos venenos, mas que nas espécies de *Micrurus* a preferência por determinadas presas é o determinante mais significativo na composição enzimática dos venenos. Conforme o mesmo trabalho demonstra, as serpentes da espécie *M. surinamensis* possuem uma alimentação baseada principalmente em peixes, enquanto que *M. frontalis* se alimentam de pequenas serpentes e anfíbios. Por serem presas muito diferentes é de se esperar que as duas serpentes necessitem de diferentes composições enzimáticas em seus venenos, uma vez que a finalidade da peçonha das serpentes é de matar, imobilizar e digerir suas presas (Jorge da Silva e Aird, 2001).

Os ensaios de Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>) e citotoxicidade foram utilizados neste trabalho para avaliar a toxicidade dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis*. Os resultados da DL<sub>50</sub> encontrados (0,75 mg/kg e 0,69 mg/kg, respectivamente) são menores do que aqueles reportados por Tanaka et al., (2010) (2,9 mg/kg e 1,1 mg/kg, respectivamente). Isso pode ser explicado pelo fato de que os venenos utilizados neste trabalho têm procedência de serpentes capturadas no Peru, enquanto que no trabalho citado, as serpentes foram capturadas em território brasileiro. Conforme descrito por diversos autores (Huang et al., 2015; Jorge da Silva e Aird, 2006; Sousa et al., 2017), os venenos de serpentes podem apresentar uma grande variação de composição quando

ocorrem mudanças geográficas no habitat das serpentes. Isso pode acontecer, por exemplo, devido a adaptações requeridas na dieta, pois os animais disponíveis para alimentação no Brasil não são os mesmos que habitam o Peru, fazendo com que a peçonha tenha que se adaptar para ser tóxica para as presas disponíveis no local de morada da serpente. Assim, explicaria o fato de que no trabalho citado acima, a dose letal média dos venenos de *M. surinamensis* e *M. frontalis* é maior que dos venenos das serpentes capturadas no Peru. Outros fatores que também podem estar relacionados a diferença de letalidade encontrada nos dois trabalhos são variações ontogenéticas, sazonais, idade e sexo da serpente (Gutiérrez et al., 2016). Desta forma, esses dados nos leva a conclusão que, neste caso, essas serpentes peruanas possuem um veneno mais tóxico em camundongos, quando comparadas com as serpentes brasileiras.

Em relação a citotoxicidade, foi possível observar que, assim como no ensaio de  $DL_{50}$ , o veneno de *M. frontalis* se apresentou mais tóxico que o de *M. surinamensis*. Isso se deve ao fato de que o veneno de *M. frontalis* foi capaz de matar 50% das células MGSO-3 em uma menor concentração ( $EC_{50} = 4,219 \mu g$ ) em comparação com o veneno de *M. surinamensis* ( $EC_{50} = 25,47 \mu g$ ). É importante ressaltar que, de acordo com o estudo de Sousa et al., (2015), não existe uma correlação positiva ou negativa entre  $DL_{50}$  e  $EC_{50}$ . No caso da comparação neste trabalho, tanto na  $DL_{50}$  quanto na  $EC_{50}$  o veneno de *M. frontalis* se demonstrou mais tóxico que o veneno de *M. surinamensis*. Entretanto é possível observar que não há uma correlação linear entre as duas medidas, uma vez que a relação entre as  $DL_{50}$  das duas serpentes (*M. Surinamensis* / *M. frontalis*) é de 1,09, enquanto que a relação entre as  $EC_{50}$  é de 6,04. Esses dados comprovam que não é possível correlacionar um veneno com uma maior citotoxicidade com sua maior letalidade. Neste caso, os ensaios *in vitro* utilizando culturas de células podem não ser preditivos para a toxicidade total de um veneno (Sousa et al., 2015).

A hialuronidase presente em grande parte dos venenos de animais peçonhentos é uma enzima não tóxica caracterizada pela capacidade de degradar o hialuronan ou ácido hialurônico. Como a presença deste componente está intimamente ligado à manutenção da integridade da matriz extracelular, sua degradação desestabiliza a matriz, facilitando a entrada de substâncias exógenas (Pessini et al., 2001). Desta forma, a hialuronidase é conhecida como “fator de espalhamento”, uma vez que hidrolisa o ácido hialurônico dos tecidos conectivos e facilita a invasão das toxinas do veneno nos vasos sanguíneos da vítima. Sendo assim, a

hialuronidase age como catalisadora do envenenamento sistêmico. Os venenos dos escorpiões são considerados como peçonhas que possuem alta atividade hialuronidásica. Um exemplo disto é veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, onde 50% de atividade hialuronidásica é produzida por apenas 0,6 µg do veneno bruto (Horta et al., 2014; Bordon et al., 2015).

A avaliação da atividade hialuronidásica nos venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* demonstrou que esses venenos apresentam esta atividade enzimática. De acordo com o trabalho de Tan e Ponnudurai (1992) os venenos do gênero *Micrurus* geralmente apresentam de moderada a alta atividade hialuronidásica. Neste mesmo trabalho, o veneno de *M. frontalis* foi o veneno que apresentou menor atividade, enquanto que o veneno de *M. lemniscatus* (serpente semi-aquática com hábitos semelhantes a *M. surinamensis*) foi um dos venenos que exibiu maior atividade. Os resultados obtidos com o nosso trabalho demonstraram que os venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* apresentaram uma quantidade semelhante de atividade desta enzima, entre 4,6 e 6,1 µg, o que pode ser considerado como atividade moderada. A diferença entre os resultados pode ser devido a diferentes metodologias utilizadas e também pelas variações encontradas nos venenos de serpentes provenientes de diferentes regiões (Gutiérrez et al., 2016).

Em comparação com os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* os venenos do gênero *Micrurus* apresentam uma atividade hialuronidásica significativamente maior. Isso pode ser explicado pelo fato de que os venenos botrópicos possuem uma alta concentração de proteases que também são capazes de degradar componentes da matriz extracelular, o que compensaria a baixa quantidade de hialuronidase (Guerra-Duarte et al., 2015).

A família das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são muito abundantes nos venenos de serpentes. Elas podem possuir diversas propriedades farmacológicas como formação de edema, neurotoxicidade pré ou pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade e agregação plaquetária (Perumal Samy et al., 2008). Nos venenos elapídicos há uma forte presença das PLA<sub>2</sub> neurotóxicas com ação pré-sináptica, exercendo papel fundamental na captura da presa por causar bloqueio na transmissão neuromuscular e consequente paralisia respiratória (De Carvalho et al., 2014). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, assim como já descrito, o veneno de *M. frontalis* apresenta uma significativa atividade fosfolipásica, o que é característico do gênero (Tan e Ponnudurai, 1992;

Montecucco e Rossetto, 2000; Leão et al., 2009; Lomonte et al., 2014; Castro et al., 2015; Gutiérrez et al., 2016).

Entretanto, apesar de apresentar proteínas com massa molecular na região das PLA<sub>2</sub>, conforme demonstrado na eletroforese e apesar de já descrito no proteoma do veneno proteínas com características de PLA<sub>2</sub> (Olamendi-Portugal et al., 2008), em nossos testes o veneno não apresentou atividade fosfolipásica considerável. Porém, outros trabalhos como o de Aird e Da Silva (1991) já demonstraram PLA<sub>2</sub> ativa no veneno de *M. surinamensis*. Esse resultado pode ser explicado por algumas possíveis teorias, como por exemplo o fato de a enzima estar inativa devido a desnaturação por consequência do manejo do veneno. Como se sabe, as proteínas e enzimas são extremamente sensíveis a variações de temperatura, agitação, pH entre outros fatores, o que ocorre comumente na manipulação dos venenos diluídos para a realização dos testes (Olamendi-Portugal et al., 2008). Outra teoria que pode estar envolvida nesta questão seria o fato de o veneno da serpente *M. surinamensis* peruana poder ser composto principalmente de fosfolipases A<sub>2</sub> que apresentam uma substituição na Lisina49, modificação esta que alteraria o sítio catalítico da enzima e, consequentemente, sua capacidade enzimática (Maraganore et al., 1984; Maraganore e Henrikson, 1985).

As proteínas conhecidas como LAAO são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de um *L*-aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (Kommoju et al., 2007). As LAAO dos venenos de serpentes têm sido caracterizadas com diversas funções como indução de apoptose, citotoxicidade, hemólise, agregação plaquetária, indução de hemorragia, edema e atividades bactericidas (Du e Clemetson, 2002). De acordo com diversos trabalhos já publicados (Olamendi-Portugal et al., 2008; Leão et al., 2009; Lomonte et al., 2014) os venenos do gênero *Micrurus* possuem de 0,2 a 3,5% de LAAO em sua composição, o que faz com que os venenos de diferentes espécies tenham quantidades variáveis de atividade desta enzima.

De acordo com Tan e Ponnudurai (1992), os venenos das cobras corais apresentam atividades de LAAO que variam de leve a moderada alta, sendo o veneno de *M. frontalis* o que apresentou menor atividade. Entretanto, no trabalho supracitado o veneno de *M. surinamensis* não foi testado, apenas o de *M. lemniscatus*, serpente que possui hábitos semelhantes ao da *M. surinamensis* e foi classificada como tendo atividade de LAAO moderada. Contudo, os resultados obtidos na

presente dissertação demonstraram que o veneno de *M. frontalis* apresentou uma atividade de LAAO considerada moderada, enquanto que o veneno de *M. surinamensis* apresentou uma baixa atividade desta enzima. Os resultados dos trabalhos se divergem, fazendo com que ainda seja necessário novos estudos sobre a composição dessa enzima nas serpentes do gênero *Micrurus*, principalmente no que se relaciona com a distribuição geográfica das serpentes, conforme já citado em discussão anterior (Huang et al., 2005; Jorge da Silva e Aird, 2006; Sousa et al., 2017).

A formação de edema está presente em envenenamentos por diversos animais peçonhentos, como serpentes (Mamede et al., 2016; Prezotto-Neto et al., 2016), escorpiões (Santos-da-Silva et al., 2017) e aranhas (Gewehr et al., 2013). Diversos mecanismos já foram elucidados com relação à formação do edema, entretanto em se tratando de venenos de serpentes, as PLA<sub>2</sub> estão direta e indiretamente envolvidas na atividade edematogênica (Sanchez et al., 1992; Lomonte et al., 1993). Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* são ricos em PLA<sub>2</sub>, desta forma diversos trabalhos já demonstraram que diferentes espécies deste gênero possuem venenos com a capacidade de gerar edema (Moraes et al., 2003; Cecchini et al., 2005; Casais-e-Silva et al., 2016). As PLA<sub>2</sub> também são conhecidas por induzir inflamação, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de leucócitos e, conseqüentemente, a formação de edema (Casais-e-Silva et al., 2016).

Concordando com os resultados já publicados em outros trabalhos, os venenos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* apresentaram, quando injetados na pata de camundongos, edema considerável já nos primeiros 15 minutos, sendo seu pico após 30 minutos (Moraes et al., 2003; Cecchini et al., 2004; Casais-e-Silva et al., 2016). O veneno de *M. frontalis* foi capaz de gerar um maior edema quando comparado com o veneno de *M. surinamensis*, o que também vai de acordo com a literatura (Cecchini et al., 2005). Essa maior atividade edematogênica pode estar relacionada a uma maior quantidade de PLA<sub>2</sub> ativa no veneno de *M. frontalis*, como já demonstrado na atividade fosfolipásica, uma vez que a presença desta enzima está diretamente relacionada com uma maior capacidade de geração de edema na vítima (Sanchez et al., 1992; Lomonte et al., 1993). Estudos já demonstraram que algumas fosfolipases A<sub>2</sub> possuem a capacidade de se ligar em sítios ainda não identificados na membrana plasmática, desestabilizando a bicamada das

células e promovendo uma série de eventos, exibindo assim, atividade pró-inflamatória (Casais-e-Silva et al., 2016).

Em estudos de avaliação farmacológica do edema provocado por venenos de serpente, observou-se que os derivados da degradação do ácido araquidônico são os principais mediadores da indução de edema, derivados estes já bem conhecidos como desencadeadores da inflamação, como prostaglandinas e tromboxano (Lopes et al., 2017). Esse mecanismo pode ser a explicação para a elevada atividade edematogênica apresentada pelo veneno de *M. frontalis*, uma vez que este apresenta, também, alta atividade fosfolipásica (Figura 12). Entretanto, para o veneno de *M. surinamensis*, que não apresentou atividade fosfolipásica *in vitro*, essa explicação não é válida. Entretanto, de acordo com Gutiérrez e Lomonte (2012), mesmo sem a capacidade catalítica, essas PLA<sub>2</sub> teriam a capacidade de induzir citotoxicidade em células endoteliais. Estudos demonstraram que resíduos localizados na região C-terminal dessas moléculas poderiam, por si só, interagir e desorganizar a membrana plasmática das células. Desta forma, acredita-se que mesmo sem atividade catalítica, as PLA<sub>2</sub> presentes no veneno de *M. surinamensis* são pró-inflamatórias, gerando assim, edema no local da picada (Gutiérrez e Lomonte, 2012).

O envenenamento por diversos animais peçonhentos é conhecido por muitas vezes gerar dor intensa no local da picada (Chacur et al., 2002; Gewehr et al., 2013; Santos-da-Silva et al., 2017; Lopes et al., 2017;). Diversos mecanismos estão envolvidos na produção da dor após os envenenamentos, como a participação da bradicinina (Chacur et al., 2002), dos eicosanoides (Lopes et al., 2017) e também pela ativação de neurônios somatossensoriais (Bohlen et al., 2011). Entretanto, em se tratando dos venenos do gênero *Micrurus*, existe uma grande controvérsia sobre os efeitos dos venenos, uma vez que em alguns casos os envenenamentos causam dor e em outros provocam parestesia. Historicamente, o envenenamento pela picada de *M. frontalis* é capaz de causar dor (Bucarety et al., 2016), o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, onde os animais injetados com este veneno apresentaram comportamento típico de nocicepção. O mecanismo pelo qual o veneno de *M. frontalis* é capaz de provocar dor ainda não está elucidado. Entretanto, estudos realizados com o veneno de *Micrurus tener tener* demonstram que existe um complexo proteico em seu veneno que tem a capacidade de se ligar especificamente a canais iônicos sensíveis a ácido, os quais estão diretamente ligados ao desenvolvimento da dor (Bohlen et al., 2011). Desta forma, é possível

que, devido às similaridades entre o gênero, o veneno de *M. frontalis* possua a mesma capacidade de induzir a dor que o veneno de *M. tener tener*.

Em se tratando dos animais injetados com o veneno de *M. surinamensis* não apresentaram o mesmo comportamento, o que sugere que o veneno possa ter efeito antinociceptivo, ou seja, possui em sua composição alguma toxina capaz de suprimir a dor causada pela ação do veneno. Este efeito já foi comprovado no trabalho de Santos (2011), onde o veneno de *M. lemniscatus* apresentou um grande potencial antinociceptivo após a realização de diversos testes para avaliar esta propriedade. No referido trabalho, o veneno chegou a apresentar maior efeito antinociceptivo que a morfina, sendo que seu mecanismo de ação é mediado pelo sistema opioide (Santos, 2011). É importante lembrar que, assim como a serpente *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* também possui hábitos semi-aquáticos, o que torna ainda mais possível uma similaridade na ação de seus venenos (Tanaka et al., 2010). Desta forma, mais estudos a respeito de uma possível ação antinociceptiva do veneno de *M. surinamensis* se faz necessária para elucidação da fisiopatologia do envenenamento.

O tratamento específico para o envenenamento por serpentes é o uso do antiveneno ou soro específico. No Brasil, são produzidos os soros anticrotálico, antibotrópico, antilaquétrico, antielapídico antibotrópico/crotálico e antibotrópico/laquétrico. Cada soro tem sua indicação de uso e é de extrema importância que os profissionais de saúde estejam bem informados acerca dos sinais e sintomas dos diferentes tipos de envenenamentos. Desta forma, aumenta-se a chance de eficácia do tratamento. Além disso, também é importante que a vítima do acidente procure uma unidade de saúde o mais rápido possível, pois a eficácia terapêutica do soro está diretamente ligada a uma maior rapidez na procura pelo atendimento (Ministério da Saúde, 2001).

O soro que deve ser utilizado em casos de envenenamento por serpentes do gênero *Micrurus* é o soro antielapídico. No Brasil, este soro é produzido através da hiperimunização em cavalos de quantidades equivalentes dos venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*. Entretanto, como já foi visto neste trabalho e em outros já publicados (Leão et al., 2009; Tanaka et al., 2010; Lomonte et al., 2014; Bucarechi et al., 2016), os venenos de *Micrurus* podem exibir uma grande diversidade de composição e toxicidade, principalmente em se tratando de espécies com hábitos alimentares diferentes e que habitam regiões muito distintas



(Tanaka et al., 2010; Tan e Ponnudurai, 1992). Desta forma, é possível que os antivenenos comerciais não sejam capazes de reconhecer plenamente todos os componentes das diferentes espécies que ocorrem dentro de uma mesma região, país ou continente (Tanaka et al., 2010).

Conforme já visto na Figura 9 e no trabalho de Tanaka et al., (2010), o veneno de *M. surinamensis* apresenta um perfil proteico muito diferente de outros venenos do gênero, apresentando uma grande concentração de proteínas abaixo de 24 kDa e nenhuma proteína acima de 31 kDa. Além disso, diversas atividades enzimáticas muito presentes em outros venenos micrúricos não são encontradas no veneno de *M. surinamensis*. Esses fatos sugerem que existe uma grande possibilidade dos anticorpos presentes nos soros comerciais não serem capazes de reconhecer e neutralizar as proteínas tóxicas deste veneno, uma vez que essas parecem ser muito diferentes dos venenos utilizados para a produção do soro.

Desta forma, um soro antiveneno de *M. surinamensis* foi produzido em coelhos para objeto de comparação com os demais soros utilizados neste trabalho. Conforme já visto nas Figura 16A e 18A, o soro produzido foi capaz de reconhecer fortemente o veneno de *M. surinamensis* tanto por ELISA quanto por Western Blot. Grande parte das proteínas observadas através do SDS-PAGE foram reconhecidas no Western Blot pelo soro antiveneno de *M. surinamensis*, indicando que essas proteínas do veneno são antigênicas. Fica comprovado, assim, a eficácia da imunização realizada para gerar anticorpos que reconhecem grande parte das proteínas do veneno.

Em contrapartida, o soro produzido nos coelhos foi capaz de reconhecer muito fracamente o veneno de *M. frontalis* por ELISA e também produziu apenas um ligeiro reconhecimento de bandas próximo a 17 kDa e abaixo de 12 kDa. Pode-se entender com esses resultados que as proteínas do veneno de *M. surinamensis* responsáveis pela indução da produção de anticorpos nos coelhos não são as mesmas presentes no veneno de *M. frontalis*, uma vez que esses anticorpos não foram capazes de demonstrar uma resposta antigênica considerável contra o veneno de *M. frontalis*. Essa diferença de reconhecimento de proteínas pode ser explicada pelo fato dos dois venenos apresentarem uma composição muito diferente entre si, fazendo com que os anticorpos produzidos contra um veneno não sejam capazes de reconhecer proteínas do outro veneno. A mesma justificativa pode ser dada para o fraco reconhecimento do veneno de *M. surinamensis* pelo soro antiveneno de *M. frontalis*, uma grande diferença de antigenicidade

das proteínas responsáveis pela indução da resposta imune (Jorge da Silva e Aird, 2001; Huang et al., 2005; Jorge da Silva e Aird, 2006; Tanaka et al., 2010, Sousa et al., 2017).

Em se tratando dos soros comerciais produzidos no Butantan e no Instituto Clodomiro Picado, pode-se observar que ambos reconheceram fracamente o veneno de *M. surinamensis* e mais fortemente o veneno de *M. frontalis*. O soro antielapídico produzido no Brasil é resultado da hiperimunização de cavalos com uma mistura dos venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*. Desta forma, é possível entender o motivo de um grande reconhecimento deste antiveneno pelo veneno de *M. frontalis*, uma vez que grande parte dos anticorpos são produzidos contra suas próprias proteínas, fazendo com que o veneno apresente um forte reconhecimento tanto por ELISA quanto por Western Blot frente a este soro. Em contraste, o veneno de *M. surinamensis*, por possui uma composição proteica muito diferente desses dois venenos, conforme já mencionado anteriormente, apresenta um baixo reconhecimento, por ambas as técnicas, frente a este soro (Jorge da Silva e Aird, 2001; Huang et al., 2005; Jorge da Silva e Aird, 2006; Tanaka et al., 2010, Sousa et al., 2017).

O soro anticorral produzido no Instituto Clodomiro Picado da Costa Rica também é obtido através da hiperimunização de cavalos, entretanto só se utiliza o veneno de *Micrurus nigrocinctus* neste procedimento. Este fato pode explicar um menor reconhecimento do veneno de *M. frontalis* em comparação com o soro produzido no Brasil, pois no soro da Costa Rica não existem imunoglobulinas específicas contra as proteínas do veneno de *M. frontalis* e sim de um outro veneno, que pode possuir semelhanças de composição por serem de uma mesma espécie. Mais uma vez, devido a grande diferença de composição do veneno de *M. surinamensis* com o restante dos venenos do gênero, um reconhecimento muito baixo do soro anticorral foi encontrado para esta espécie (Tanaka et al., 2010). Um estudo imunoquímico realizado com o intuito de avaliar a imunogenicidade de diferentes espécies de *Micrurus* já demonstrou que o veneno de *M. surinamensis* possui um perfil de antigenicidade muito diferente das outras espécies do gênero, o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho (Alape-Giron et al., 1993).

Outros estudos já avaliaram a reatividade cruzada de diferentes venenos com diferentes soros. Ramos et al., (2017) demonstraram que o soro antielapídico polivalente produzido na Austrália foi capaz de reconhecer diversos venenos de diferentes espécies de *Micrurus* sul-

americanas. Costal-Oliveira et al., (2012) também demonstraram uma forte reatividade cruzada entre soros e venenos de diferentes espécies de escorpiões. Em relação ao veneno de aranha marrom, também já foram demonstrados trabalhos com forte reconhecimento de um único soro por diferentes espécies, evidenciando o fato de muitas vezes existir uma grande semelhança entre venenos de uma mesma espécie, família ou até mesmo ordem (Costal-Oliveira et al., 2012; Guerra-Duarte et al., 2014). O estudo sobre possíveis reações cruzadas entre venenos é importante por diversos motivos, como identificar possíveis grupos proteicos que sejam semelhantes entre os venenos, minimizar o problema de escassez de alguns antivenenos comerciais devido à dificuldade de obtenção dos venenos e, também, de se analisar qual a ideal composição de um antiveneno em determinadas regiões, favorecendo, assim, uma melhor prestação do serviço para a população (Costal-Oliveira et al., 2012; Ramos et al., 2017).

A soroneutralização em camundongos vem sendo muito utilizada para a avaliação da potência dos soros hiperimunes para uso humano. Para o soro antielapídico, cada mililitro deve conter imunoglobulinas suficientes para neutralizar 1,5 mg de veneno de referência de *M. frontalis* (Farmacopeia Brasileira, 2010). Desta forma, para avaliar a capacidade de neutralização do soro produzido em coelhos e dos soros comerciais, camundongos foram injetados com o veneno de *M. surinamensis* pré-incubado com os diferentes soros. Os resultados encontrados confirmam o que já tinha sido determinado nos ensaios de ELISA e Western Blot. O soro antiveneno de *M. surinamensis* foi capaz de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno, uma vez que todos os animais injetados neste grupo sobreviveram. Já os grupos injetados com os soros comerciais do Brasil e da Costa Rica, tiveram apenas 50% de neutralização, uma vez que metade dos animais morreram.

Tanaka et al., (2010) já haviam demonstrado que o soro comercial produzido pelo Butantan não era capaz de neutralizar os efeitos tóxicos de diferentes espécies de *Micrurus*. Um antiveneno elapídico multivalente preparado através de uma mistura dos venenos de *M. nigrocinctus*, *M. mipartitus* e *M. frontalis*, foi capaz de neutralizar os efeitos tóxicos das espécies de corais mais importantes da América do Sul e Norte, como *M. fulvius*, *M. alleni*, *M. carinicaudus dumerilli*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus* e *M. spixxi*. Entretanto, este mesmo soro multivalente também não foi capaz de neutralizar o veneno de *M. surinamensis* (Bolaños et al., 1978).

Esses resultados demonstram, mais uma vez, que o veneno de *M. surinamensis* possui uma composição proteica e, consequentemente, tóxica muito diferente das outras espécies do gênero. Essa diferença pode ser evidenciada pelo perfil eletroforético apresentado pelo veneno e pela não neutralização do mesmo pelos soros comerciais (Bolaños et al., 1978; Tanaka et al., 2010).

Desta forma, podemos inferir que o soro amplamente utilizado no Brasil (Instituto Butantan) e o soro utilizado em outros países da América do Sul e Central (Instituto Clodomiro Picado) não são completamente capazes de neutralizar as principais atividades tóxicas presentes nos venenos de diferentes espécies de *Micrurus*, indicando que outros venenos deveriam ser incluídos na mistura para a imunização de cavalos. Com o intuito de diminuir a quantidade da morbimortalidade decorrente de acidentes com animais peçonhentos em países da América Latina, a produção de um soro continental deveria ser levada em conta. Isto contribuiria para a saúde pública dos países que possuem pouca ou nenhuma produção de soros, uma vez que estes adquiririam soros eficazes para o tratamento da maioria dos acidentes que ocorrem em seu país. Esta questão já foi proposta por Bolaños et al na década de 70, entretanto até agora este objetivo ainda não foi alcançado (Bolaños et al., 1978; Tanaka et al., 2010). Uma outra opção seria a inclusão do veneno *M. Surinamensis* na produção dos soros que servirão para tratar regiões endêmicas com a serpente *M. Surinamensis*.

## 5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que, o veneno de *M. surinamensis* possui um perfil eletroforético muito diferente do apresentado pelo veneno de *M. frontalis*. Além disso, foi possível constatar que o veneno de *M. surinamensis* possui atividade hialuronidásica e edematogênica, enquanto o veneno de *M. frontalis* apresenta, além destas, as atividades de LAAO, fosfolipásica e capacidade de gerar nocicepção. Através dos estudos imunológicos, concluímos que as proteínas responsáveis por gerar os anticorpos presentes nos soros comerciais não são diferentes daquelas presentes no veneno de *M. surinamensis*. Isso se deve ao fato de que o soro produzido nos coelhos contra o veneno de *M. surinamensis* foi capaz de reconhecer fortemente o veneno correspondente, tanto por ELISA quanto por Western Blot, enquanto que o soro antielapídico do Brasil e anticorral da Costa Rica, foram capazes de reconhecer apenas parcialmente este veneno. Já o veneno de *M. frontalis*, que está presente na mistura da imunização dos soros comerciais, não foi bem reconhecido pelo soro produzido nos coelhos, mas apresentou alto reconhecimento com os soros comerciais. O mesmo perfil foi observado na neutralização da letalidade do veneno de *M. surinamensis*, pois apenas o soro produzido nos coelhos foi capaz de neutralizar a toxicidade em todos os animais desafiados com o respectivo veneno.

Concluímos ainda, que existe uma necessidade de revisão na produção dos soros antielapídicos para as regiões que sofrem acidentes com a serpente *M. surinamensis*.

## REFERÊNCIAS

- Aird, S. D.; Da Silva, N. J. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol.* 1991; v. 99, n. 2, p. 287-94.
- Alape-Giron, A.; Lomonte, B.; Gustafsson, B.; Jorge Da Silva, N.; Thelestam, M. Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon.* 1993. v. 32, n. 6, p. 713-723.
- Barbaro, K. C.; Knysak, I; Martins, R.; Hogan, C.; K., Winkel. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon.* 2005. v. 45, n. 5, p. 489-499.
- Bérnils, R. S.; COSTA, H. C. (org.). Sociedade Brasileira de Herpetologia. *Brazilian reptiles – List of species.* 2016. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2016.
- Bohlen, C. J.; Chesler, A. T.; Sharif-Naeini, R.; Medzihradszky, K.F.; Zhou, S.; King, D.; Sánchez, E. E.; Burlingame, A. L.; Basbaum, A. I.; Julius, D. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature.* 2011. v. 479, p. 410-414.
- Bordon, K. C. F.; Wiesel, G. A.; Amorim, F. G.; Arantes, E. C. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2015. v. 21, n. 43, p. 1-12.
- Bolaños, R.; Cerdas, L.; Abalos, J. W. Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalente antivenom for the Americas. *Bull Pan Am Health Organ.* 1978. v. 12, p. 27-27.
- Brazil, O. V. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hospital.* 1965. v. 68, p. 183-224.
- Brazil, O. V. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev Assoc Méd Bras.* 1980. v. 26, p. 212-218.

Brazil, O. V. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. Ver Inst Med Trop São Paulo. 1987. v. 29, p. 119-126.

Brazil, O. V. Sinais e sintomas neurotóxicos do envenenamento ofídico: ação central ou periférica da peçonha das serpentes. Rev Assoc Méd Bras. 1990. v. 36, p. 63-65.

Bucaretschi, F.; De Capitani, E. M.; Vieira, R. J.; Rodrigues, C. K.; Zannin, M.; Da Silva Jr, N. J.; Casais-e-Silva, L. L.; Hyslop, S. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. Clin Toxicol (Phila). 2016. v. 54, p. 222-234.

Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S.; Wen, F. H. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo - SP, Ed Savier, p.468, 2003.

Casais-e-Silva, L. L.; Teixeira, C. F. P.; Lebrun, I.; Lomonte, B.; Alape-Girón, A.; Gutiérrez, J. M. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. Toxicol Lett. 2016. v. 257, p. 60-71.

Castro, K. L.; Guerra-Duarte, C.; Ramos, H. R.; Machado-de-Ávila, R. A.; Schneider, F. S.; Oliveira, D.; Freitas, C. F.; Kalapothakis, E.; Ho, P. L.; Chávez-Oloórtgui, C. Toxicon. 2015. v. 93, p. 51-60.

Cecchini, A. L.; Marcussi, S.; Silveira, L. B.; Borja-Oliveira, C. R.; Rodrigues-Simioni, L.; Amara, S.; Stábeli, R. G.; Giglio, J. R.; Arantes, E. C.; Soares, A. M. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2005. v. 140, n. 1, p. 125-34.

Chacur, M.; Picolo, G.; Teixeira, C. F. P.; Cury, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. Toxicon. 2002. v. 40, p. 1047-1051.

Ciscotto, P. H.; Rates, B.; Silva, D. A.; Richardson, M.; Silva, L. P.; Andrade, H.; Donato, M. F.; Cotta, G. A.; Maria, W. S.; Rodrigues, R. J.; Sanchez, E.; De Lima, M. E.; Pimenta, A. M. Venomi analysis and

evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. J Proteomics. 2011. v. 74; p. 1810-1825.

Costal-Oliveira, F.; Guerra-Duarte, C.; Machado-de-Ávila, R. A.; Melo, M. M.; Bordon, K. C.; Arantes, E. C.; Paredes, N. C.; Tintaya, B.; Bonilla, C.; Bonilla, R. E.; Suarez, W. S.; Yarleque, A.; Fernandez, J. M.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olórtegui, C. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. Toxicon. 2012. v. 60, p. 934-942.

Daltry, J. C.; Wüster, W.; Thorpe, R. S. Diet and snake venom evolution. Nature. 1996. v. 379, p. 537-540.

Damico, D. C. S.; Nascimento, J. M.; Lomonte, B.; Ponce-Soto, L. A.; Joazeiro, P. P.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Collares-Buzato, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. Toxicon. 2007. v. 49, p. 678-692.

De Carvalho, N. D.; Garcia, R. C.; Ferreira, A. K.; Batista, D. R.; Cassola, A. C.; Maria, D.; Lebrun, I.; Carneiro, S. M.; Afeche, S. C.; Marcourakis, T.; Sandoval, M. R. Neurotoxicity of coral snake phospholipases A<sub>2</sub> in cultured rat hippocampal neurons. Brain Res. 2014. v. 1552, p. 1-16.

De Oliveira, J.; da Silva, A. R.; Soares, M. B.; Stephano, M. A.; Dias, W. O.; Raw, I.; Ho, P. L. Cloning and characterization of an aneurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. v. 267, p. 887-891.

De Oliveira Junior, N. G.; Silva Cardoso, M. H.; Franco, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. Cell Mol Life Sci. 2013. v. 70, p. 4645-4658.

Du, X.Y.; Clemetson, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. Toxicon. 2002. v. 40, p. 659- 665.

Guerra-Duarte, C.; Bonilla, C.; Guimarães, G.; Machado-de-Ávila, R. A.; Mendes, T. A.; Silva, W.; Tintaya, B.; Yarleque et al, 2015. Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic



protein of Brazilian *Loxosceles intermedia* spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru. *Toxicon*. 2014. p. 1-4.

Farmacopeia Brasileira. 5ª edição. Brasília: Anvisa, 2010. p. 1299-1301

Ferrer, V. P.; De Mari, T. L.; Gremski, L. H.; Trevisan-Silva, D.; Da Silveira, R. B. Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. v. 7, n. 5, p. 1-12.

Finney, D.J. Probit Analysis. Cambridge University Press. 1971.

Francis, B.; Jorge da Silva Jr, N.; Casais e Silva, L. L.; Seebart, C.; Kaiser, I. I. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*. 1997. v. 35, p. 1193-1203.

Gewehr, C.; Oliveira, S. M.; Rossato, M. F.; Trevisan, G.; Dalmolin, G. D.; Rigo, F. K.; Castro-Júnior, C. J.; Cordeiro, M. N.; Ferreira, J.; Gomez, M. V. Mechanisms Involved in the Nociception Triggered by the Venom of the Armed Spider *Phoneutria nigriventer*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. v. 7, n. 4, p. 1-15.

Goularte, F. C.; Cruz-Hofling, M. A.; Cogo, J. C.; Gutiérrez, J. M.; Rodrigues Simioni, L.; The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon*. 1995. v. 33, p. 679-689.

Guerra-Duarte, C.; Lopes-Peixoto, J.; Fonseca-de-Souza, B. R.; Stransky, S.; Oliveira, D.; Schneider, F. S.; Lopes-de-Souza, L.; Bonilla, C.; Silva, W.; Tintaya, B.; Yarleque, A.; Chávez-Olórtegui, C. Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. *Toxicon*. 2015. v. 108, p. 84-96.

Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B.; Portilla, E.; Cerdas, L.; Rojas, E. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venom from five species. *Toxicon*. 1983. v. 21, p. 777-783.

Gutiérrez, J. M. e Lomonte, B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*. 2012. v. 62, p. 27-39.

Gutierrez J. M.; Lomonte, B.; Aird, S.; Silva-Junior, N. J. Mecanismos de ação dos venenos das cobras-corais. In: *As cobras-corais do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos.* ” ResearchGate. 2016. p. 304-329.

Horta, C. C. R.; Magalhães, B. D. F.; Oliveira-Mendes, B. B. R.; Do Carmo, A. O.; Duarte, C. G.; Felicori, L. F.; Machado-de-Avila, R. A.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014. v. 8, e2693, p. 1-14.

Huang, H. W.; Liu, B. S.; Chien, K. Y.; Chiang, L. C.; Huang, S. Y.; Sung, W. C.; Wu, W. G. Cobra venom proteome and glycome determined from individual snakes of *Naja atra* reveal medically important dynamic range and systematic geographic variation. *J Proteomics*. 2015. v. 128, p. 92-104.

Instituto Butantan. Bula para soro antielapídico (bivalente). Versão nº 02/16.

Jiang, Y.; Li, Y.; Lee, W.; Xu, X.; Zhang, Y.; Zhao, R.; Zhang, Y.; Wang, W. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC Genomics*. 2011. v. 12, n. 1, p. 1-13.

Jorge da Silva, N. e Aird, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp Biochem and Physiol*. 2006. v. 128, p. 425–456.

Kommoju, P. R.; Macheroux, P.; Ghisla, S. Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Protein Expr Purif*. 2007. v. 52, p. 89-95.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. v. 227, p. 680-685.

Leão, L. I.; Ho, P. L.; Junqueira-De-Azevedo, I. D. L. M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*. 2009. v. 10, p. 112.

Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Hanson, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*. 1993. v. 17, p. 93-105.

Lomonte, B.; Fernández, J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Sasa, M.; Gutiérrez, J. M.; Calvete, J. J. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *J Proteomics*. 2014. v. 105, p. 323-339.

Lopes, P. H.; Rocha, M. M. T.; Kuniyoshi, A. K.; Portaro, F. C. V.; Gonçalves, L. R. C. Edema and nociception induced by *Philodryas patagoniensis* venom in mice: a pharmacological evaluation with implications for the accident treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017. v. 361, p. 349-354.

Mackessy, S. P. The Field of Reptile Toxinology: Snakes, Lizards and Their Venoms. In: *Handbook of Venoms and Toxins*. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2010. Chap. 1, p. 3-24.

Mamede, C.C.; De Sousa, B. B.; Pereira, D. F.; Matias, M. F.; De Queiroz, M. R.; De Moraes, N.C.; Vieira, S. A.; Stanziola, L.; De Oliveira, F. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*. 2016. v. 117, p. 37-45.

Maraganore, J. M.; Merutka, G.; Cho, W.; Welches, W.; Kézdy, F. J.; Heinrikson, R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem*. 1984. v. 259, 13839-13843.

Maraganore, J. M.; Heinrikson, R. L. The role of lysyl residues of phospholipases A<sub>2</sub> in the formation of the catalytic complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985. v. 131, p. 129-138.

Ministério da Saúde (BR), Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais peçonhentos. 2. ed. Brasília: Brasil, 2001.

Ministério da Saúde, SINAN - Portal da Saúde - [www.Saude.gov.br](http://www.Saude.gov.br) - Vigilância. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

Montecucco, C. e Rossetto, O. How do presynaptic PLA<sub>2</sub> neurotoxins block nerve terminals? *Trends in Biochem Sci*. 2000. v. 25, p. 266-270.

Moraes, F. V.; Sousa-e-Silva, M. C.; Barbaro, K. C.; Leitão, M. A.; Furtado, M. F. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*. 2003. v. 41, p. 71-79.

Moreira, K. G.; Prates, M. V.; Andrade, F. A.; Silva, L. P.; Beirão, P. S.; Kushmerick, C.; Naves, L. A.; Bloch, C. Jr. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*. 2010. v. 56, n. 1, p. 55-63.

Olamendi-Portugal, T.; Batista, C. V. F.; Restano-Cassulini, R.; Pando, V.; Villa-Hernandez, O.; Zavaleta-Martinez-Vargas, A.; Salas-Arruz, M. C.; Rodriguez De la Vega, R. C.; Becerril, B.; Possani, L. D. Proteomics analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. 2008. v.8, 1919-1932.

Perumal Samy, R.; Gopalakrishnaone, P; Ho, B.; Chow, V. T. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie*. 2008. v. 90, n. 9, p. 1372-1388.

Pessini, A. C.; Takao, T. T.; Cavalheiro, E. C.; Vichnewski, W.; Sampaio, S. V.; Giglio, J. R.; Arantes, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*. 2001. v. 39, p.1495-1504.

Pinho, F. M. O.; Pereira, I. D. Ofidismo. *Rev Assoc Méd Bras, Brasil*. 2001. v.47, n.1.

Prezotto-Neto, J. P.; Kimura, L. F.; Alves, A. F.; Gutiérrez, J. M.; Otero, R.; Suárez, A. M.; Santoro, M. L.; Barbaro, K. C. Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica. *Exp Biol Med (Matwood)*. 2016. v. 241, p. 2075-2085.

Quan, D. North American poisonous bites and stings. *Critical care clinics*. 2012. v. 28, n. 4, p. 633–59.

Ramos, H. R.; Vassão, R. C.; De Roodt, A. R.; Santos e Silva, E. C.; Mirtschin, P.; Ho, P. L.; Spencer, P. J. Cross neutralization of coral snake venoms by commercial Australian snake antivenoms. *Clin Toxicol (Phila)* 2017. v. 55, p. 33-39.

Sanchez, E. F.; Freitas, T. V.; Ferreira-Alves, D. L.; Velarde, D. T.; Diniz, M. R.; Cordeiro, M. N.; Agostini-Cotta, G.; Diniz, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992. v. 30, p. 95–103.

Santos, G. G. L. Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira) [dissertação de mestrado]. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. Salvador: Fundação Osvaldo Cruz; 2011.

Santos-da-Silva, A.; Candido, D. M.; Nencioni, A. L.; Kimura, L. F.; Prezotto-Neto, J. P.; Barbaro, K. C.; Chalkidis, H. M.; Dorce, V. A. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom 3 in rats and mice. *Toxicon*. 2017. v. 126, p. 51-58.

Silva, A. S. T. *Soros e Vacinas*. São Paulo: Instituto Butantan, 2013. 59 p.

Silva Junior, N. J. e Bucaretychi, F. Mecanismos de Ação do Veneno Elapídico e Aspectos Clínicos dos Acidentes. Em: Animais Peçonhentos no Brasil. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 9, p. 116-124.

Souza, B. M.; Nascimento, A. E. R.; Gomides, S. C.; Rios, C. H. V.; Hudson, A. A.; Novelli, I. A. Répteis em fragmentos de Cerrado e Mata Atlântica no Campo das Vertentes, Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. Biota Neotrop. 2006. v. 10, n. 2, 2006.

Sousa, L. F.; Portes-Junior, J. A.; Nicolau, C. A.; Bernardoni, J. L.; Nishiyama-Jr, M. Y.; Amazonas, D. R.; Freitas-de-Sousa, L. A.; Mourão, R. H.; Chalkidis, H. M.; Valente, R. H.; Moura-da-Silva, A. M. Functional proteomic analyses of Bothrops atrox venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. J Proteomics. 2017. v. 21, p. 32-46.

Sousa, L. L.; Stransky, S.; Guerra-Duarte, C.; Flor-Sá, A. Schneider, F. S.; Kalapothakis, E.; Chávez-Olórtegui, C. Toxicol Sci. 2015. v. 147, p. 458-465.

Tambourgi, D. V.; Dos Santos, M. C.; Furtado, M. F.; Freitas, M. C. W.; Dias da Silva, W.; Kipnis, T. L. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. Br. J. Pharmacol. 1994. v. 112, p. 723-727.

Tan, N. H. e Ponnudurai, G. The biological properties of venoms of some American Coral Snakes (Genus *Micrurus*). Comp Biochem Physiol B. 1992. v. 101, p. 471-474.

Tanaka, G. D.; Furtado, M. F. D.; Portaro, F. C. V.; Sant'Anna, O. A.; Tambourgi, D. V. Diversity of *Micrurus* Snake Species Related to Their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. PLoS Negl Trop Dis. 2010. v. 4, e622.

Uetz, T. The EMBL reptile database. [2016]. Disponível em: <<http://www.reptiledatabase.org/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

Uudaneta, A. H.; Bolaños, F.; Gutiérrez, J. M. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes:

Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004. v. 138, n. 4, p. 485–492.

Vonk, F. J.; Jackson, K.; Doley, R.; Madaras, F.; Mirtschin, P. J.; Vidal, N. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. *BioEssays*. 2011. v. 33, n. 4, p. 269-279.

WHO. WHO|Snakebite. Disponível em:  
<http://www.who.int/ipcs/poisons/snakebite/en/>. Acesso em: 02 dez.  
2016.

## **ANEXO (S)**



## ANEXO A – Certificado CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização biológica, imunoquímica e mutagênica do veneno da serpente *Micrurus surinamensis* (Cuvier, 1817).", registrada com o protocolo nº 012/2017-1, sob a responsabilidade de **Ricardo Andrez Machado de Avila**, junto à equipe: Carlos Delfin ChavezOlortegui, Daysiane de Oliveira, Rahisa Scussel, Paula Ronsani Ferro, Alessandra Milioli, Luiza Macarini Bosa, Vanessa Moraes de Andrade, Adriani Paganini Damiani, Maiara Pereira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 07/03/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2017 a 31/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	78
Idade/Peso	28-35 dias / 18-22 g
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:


Project title: "Biological, immunochemistry and mutagenic characterization of *Micrurus surinamensis* snake venom."  
Protocol number: 012/2017-1

Principal Investigator: **Ricardo Andrez Machado de Avila**

Researchers: **Carlos Delfin ChavezOlortegui, Daysiane de Oliveira, Rahisa Scussel, Paula Ronsani Ferro, Alessandra Milioli, Luiza Macarini Bosa, Vanessa Moraes de Andrade, Adriani Paganini Damiani, Maiara Pereira.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 07 de março de 2017.

  
**Jairo José Zocche**  
Coordenador da CEUA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

Criciúma  
2017